

**Mikrobielle Glycolipide: strukturelle Modifikationen durch  
Biokatalyse und Biokonversion  
sowie Untersuchungen ihrer Eigenschaften**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhemina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Verena Kerstin Recke

aus Plauen

1. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang

2. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues

eingereicht am: 03.12.2012

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.02.2013

Druckjahr 2013

## **Vorabveröffentlichungen**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Lang, S.: Enzymatic modification of microbial glycolipids. (Poster) 43. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker, Weimar (2010)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Wray, V., Lang, S.: Modification of Microbial Glycolipids by Glycosidases and Lipases. (Poster) 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2010)

Recke, V.K., Park, J.B., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Wray, V., Lang, S.: Production of New Glycolipids via Biocatalytic Transformation. (Poster) 8th EuroFedLipid Congress, München (2010)

Recke, V.K., Park, J.B., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Wray, V., Lang, S.: Lipase-catalyzed Acylation of Microbial Sophorolipids. (Poster) 4th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe (2011)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Lang, S.: Biocatalytical Modification of Microbial Glycolipids. (Poster) CASCAT Chemoenzymatic Processes New Synergies Between Chemistry and Biochemistry, Training School 2011, Certosa di Pontignano, Italien (2011)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Wray, V., Lang, S.: Modification of Microbial Glycolipids via Biocatalysis. (Vortrag) 9th EuroFedLipid Congress, Rotterdam, Niederlande (2011)

Recke, V.K., Beyrle, C., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Syldatk, C., Wray, V., Lang, S.: Biocatalytic Modification of Microbial Mannosylerythritol Lipids. (Poster) 1st European Congress of Applied Biotechnology und 29. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Berlin (2011)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Syldatk, C., Wray, V., Tokuda, H.; Lang, S.: Enzymatic Modification of Microbial Alkyl-Sophorosides. (Poster) Catalyzing Bio-Economy – Biocatalysts for Industrial Biotechnology, Annual meeting of the DECHEMA-Section Biotransformations, Frankfurt/Main (2012)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Syldatk, C., Wray, V., Tokuda, H.; Lang, S.: Modification of Microbial Glycolipids by Glycosidases and Lipases. (Vortrag) Biocatalysis in Lipid Modification, Greifswald (2012)

Recke, V.K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Syldatk, C., Wray, V., Tokuda, H.; Lang, S.: Enzymatic Modification of Microbial Glycolipids. (Vortrag) ESBES 9th European Symposium on Biochemical Engineering Science & 15th European Congress on Biotechnology, Istanbul, Türkei (2012)

Meinem Opa Manfred

Experience is one thing you can't get for nothing.

- Oscar Wilde -



## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik in der Arbeitsgruppe Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die Möglichkeit zur Promotion, die vielseitige Unterstützung während der Bearbeitung, der umfassenden Hilfe beim Auswerten der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk für die Beteiligung als 4. Prüfer.

Ein weiterer Dank geht an unsere Partner vom KIT in Karlsruhe, die mit im DFG-Projekt vertreten waren. Hierbei sind Herr Prof. Dr. Christoph Syldatk, Herr Prof. Dr. Rudolf Hausmann und die Doktorandin Melanie Gerlitzki zu nennen. Vielen Dank für die regen Diskussionen und Anregungen für die weitere Arbeit während der zahlreichen Projekttreffen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Victor Wray vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung bedanken, der uns mit der Interpretation und Analyse der NMR- und MS-Spektren immer mit Rat und Tat zur Seite stand und der mit seiner Hilfe die Strukturaufklärung neuer Substanzen ermöglichte. Ebenso möchte ich Frau Christel Kakoschke für die Aufnahme der zahlreichen Spektren danken.

Unserem Kooperationspartner in Japan, Herrn Dr. Harukuni Tokuda von der Kanazawa Universität, möchte ich ganz herzlich für die Durchführung der Bioaktivitätstests danken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Wolfgang Graßl, der immer für technische Fragen, Reparaturen und neue Versuchsaufbauten zur Seite stand und mich tatkräftig unterstützt hat. Ohne ihn wäre Vieles nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Bachelorarbeiterinnen Catharina Beyrle, Clarissa Müller und Jun Bum Park, die meine Ideen und Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten in die Tat umgesetzt und mich so bei meiner Arbeit unterstützt haben. Ebenso möchte ich mich bei Dimitri Iphöfer, der mich in einige Arbeitsgeräte eingewiesen und mir wichtige Techniken für meine Arbeit gezeigt hat, bedanken. Svenja Kiesel und Christian Adis, die mich als Hiwis unterstützt haben, danke ich für die Durchführung von zahlreichen Kultivierungsansätzen und die Probenaufarbeitung. Jun Bum Park gilt ein herzlicher Dank für ihre tatkräftige Unterstützung über ihre Bachelorarbeit hinaus.

Für interessante Gespräche, moralische Unterstützung, eine angenehme Arbeitsatmosphäre, gemeinsame Kaffeerunden und Kochabende möchte ich mich bei meinen Kollegen Linda Kilian, Ileana Jurchescu, Stefanie Wöhl-Bruhn, Julika Wrenger, Sven Bergmann, Lars Freund und Malte Ringleb bedanken. Linda Kilian danke ich insbesondere für das Gegenlesen englischer Artikel und das Drucken von zahlreichen Postern. Meiner Laborkollegin Stefanie Wöhl-Bruhn möchte dafür danken, dass sie mich immer wieder motiviert und aufgebaut hat und mit der ich viel über Wissenschaftliches und Nichtwissenschaftliches diskutieren konnte. Weiterhin möchte ich Anne Glaesener und Anja Zwerenz für das Korrekturlesen meiner Arbeit und damit verbundenen zahlreichen hilfreichen Kommentaren danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden und vor allem bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich bei allen meinen Vorhaben unterstützt hat. Meinem Bruder Norbert danke ich für die Unterstützung beim Layouten und das Beantworten von technischen Fragen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Tenside .....	1
1.2	Biotenside .....	2
1.2.1	Glycolipide .....	3
1.3	Modifikationen von Glycolipiden .....	13
1.3.1	Modifikation von Sophoroselipiden .....	13
1.3.2	Modifikation von Mannosylerythritol-Lipiden .....	16
1.3.3	Modifikation anderer Glycolipide .....	18
1.4	Zielsetzungen.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1	Mikroorganismen .....	22
2.1.1	Mikroorganismen für Glycolipidproduktion .....	22
2.1.2	Mikroorganismen für Agardiffusionstests .....	22
2.2	Verwendete Enzyme .....	23
2.3	Verbrauchsmaterial .....	23
2.4	Laborgeräte und Zubehör .....	24
2.5	Chemikalien.....	24
2.6	Nährmedien.....	25
2.6.1	Agarmedien .....	25
2.6.2	Vorkulturmedien .....	26
2.6.3	Hauptkulturmedien .....	27
2.7	Workflow.....	28
2.8	Kultivierung von <i>Candida bombicola</i> mit 2-Dodecanol als Co-Substrat .....	29
2.8.1	Stammhaltung .....	29
2.8.2	Vorkultur .....	29
2.8.3	Hauptkultur .....	29
2.8.4	Aufarbeitung und Isolierung der 2-Dodecyl-Sophoroside .....	29

<b>2.9</b>	<b>Kultivierung von <i>Candida bombicola</i> mit 2-Tridecanon als Co-Substrat .....</b>	<b>30</b>
<b>2.10</b>	<b>Kultivierung von <i>Pseudozyma aphidis</i> .....</b>	<b>30</b>
2.10.1	Stammhaltung .....	30
2.10.2	Vorkultur .....	30
2.10.3	Hauptkultur .....	30
2.10.4	Aufarbeitung und Isolierung der Mannosylerythritol-Lipide .....	31
<b>2.11</b>	<b>Trennung der verschiedenen Glycolipidkomponenten mittels MPLC .....</b>	<b>31</b>
<b>2.12</b>	<b>Enzymatische Methoden zur Modifikation der Glycolipide .....</b>	<b>32</b>
2.12.1	Modifikation der 2-Dodecyl-Sophoroside .....	32
2.12.2	Modifikation der Mannosylerythritol-Lipide.....	34
<b>2.13</b>	<b>Analytische Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.13.1	Dünnschichtchromatographie.....	35
2.13.2	Strukturaufklärung der Glycolipide .....	36
<b>2.14</b>	<b>Physicochemische Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.14.1	Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser .....	36
2.14.2	Bestimmung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan .....	37
2.14.3	Bestimmung der Emulsionsstabilität .....	37
<b>2.15</b>	<b>Untersuchung von biologischen Aktivitäten.....</b>	<b>38</b>
2.15.1	Agardiffusionstest .....	38
2.15.2	<i>In vitro</i> -Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität.....	39
2.15.3	<i>In vivo</i> -„two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Projektteil: 2-Dodecyl-Sophoroside .....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Kultivierung, Isolierung und Aufarbeitung der Ausgangssubstanzen für die nachfolgenden Modifikationen.....	42
3.1.2	Enzymatische Modifikation an 2-Dodecyl-Sophorosiden und 2-Dodecyl- Glucosiden .....	43
3.1.3	Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS.....	52
3.1.4	Physicochemische Charakterisierung der modifizierten Glycolipide.....	65
3.1.5	Biologische Aktivitäten der modifizierten Glycolipide .....	73

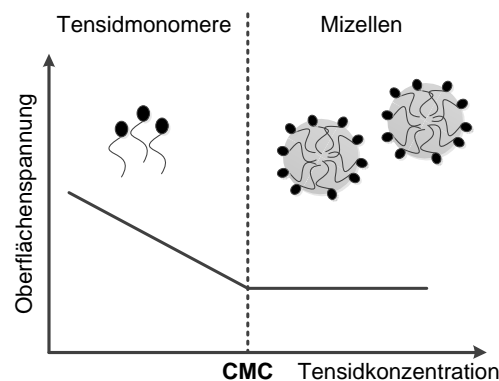
3.1.6	Bilanz zum Abschnitt 3.1 .....	77
<b>3.2</b>	<b>Projektteil: Mannosylerythritol-Lipide .....</b>	<b>78</b>
3.2.1	Kultivierung, Isolierung und Aufarbeitung der Ausgangssubstanzen für die nachfolgenden Modifikationen .....	78
3.2.2	Enzymatische Modifikation an Mannosylerythritol-Lipiden .....	79
3.2.3	Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS .....	81
3.2.4	Physicochemische Charakterisierung der modifizierten Glycolipide .....	87
3.2.5	Biologische Aktivitäten der modifizierten Glycolipide .....	92
3.2.6	Bilanz zum Abschnitt 3.2 .....	94
<b>3.3</b>	<b>Projektteil: Kultivierung von <i>C. bombicola</i> mit 2-Tridecanon als Co-Substrat .....</b>	<b>95</b>
3.3.1	Kultivierung von <i>C. bombicola</i> mit 2-Tridecanon als Co-Substrat .....	95
3.3.2	Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS .....	96
3.3.3	Physicochemische Charakterisierung der neuen Glycolipide .....	102
3.3.4	Biologische Aktivität der neuen Glycolipide .....	104
3.3.5	Bilanz zum Abschnitt 3.3 .....	105
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Projektteil: 2-Dodecyl-Sophoroside .....</b>	<b>108</b>
4.1.1	Mikrobielle Nachproduktion der Edukte .....	108
4.1.2	Enzymatische Modifikation an 2-Dodecyl-Sophorosiden und 2-Dodecyl- Glucosiden .....	108
<b>4.2</b>	<b>Projektteil: Mannosylerythritol-Lipide .....</b>	<b>112</b>
4.2.1	Mikrobielle Nachproduktion der Edukte .....	112
4.2.2	Modifikation an MEL-A und MEL-B mittels Lipase-Katalyse .....	112
<b>4.3</b>	<b>Projektteil: Kultivierung von <i>C. bombicola</i> mit 2-Tridecanon als Co-Substrat .....</b>	<b>113</b>
<b>4.4</b>	<b>Physicochemische Eigenschaften und biologische Aktivitäten der neuartigen Glycolipide .....</b>	<b>116</b>
<b>I</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>II</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>123</b>
<b>III</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>124</b>

IV	Abkürzungsverzeichnis .....	134
V	Anhang.....	135
	1. Tabellen zur Strukturaufklärung .....	135
	2. Tabellen zum <i>in vivo</i> -Aktivitätstest.....	140

# 1 Einleitung

## 1.1 Tenside

Substanzen, die gleichzeitig einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Teil aufweisen, werden als Tenside bezeichnet. Dieser amphiphile Charakter verleiht ihnen die Fähigkeit an Phasenübergängen grenzflächenaktiv zu sein. In Wasser reichern sich die Tenside an Grenz- und Oberfläche an und bilden einen Adsorptionsfilm. Dadurch wird die Ober- bzw. Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der angrenzenden Phase verringert. Außerdem kommt es zur Veränderung der Benetzungseigenschaften zwischen Wasser und Feststoffen und bei absorbierten Tensiden mit ionisationsfähigen Gruppen kommt es zur Ausbildung von elektrischen Doppelschichten an den Grenzflächen (Lang und Trowitzsch-Kienast 2002).



**Abb. 1.1: Beziehung zwischen Tensidkonzentration, Oberflächenspannung und Mizellbildung (modifiziert nach Soberón-Chávez und Maier 2011)**

In Lösung bilden Tenside zudem beim Überschreiten einer charakteristischen Konzentration durch reversible Aggregation größere Molekülverbände, sogenannte Mizellen. Bilden sich in Wasser als Lösungsmittel Mizellen aus, befinden sich die hydrophoben Gruppen im Inneren, d.h. ohne Kontakt zu der wässrigen Phase, die hydrophilen Gruppen hingegen ragen direkt in die umgebende Wasserphase. Dabei ist die Mizellbildung abhängig vom jeweiligen Tensidmolekül und dessen spezifischer Konzentration, ab der diese Bildung erfolgt (Abb. 1.1, (Soberón-Chávez und Maier 2011)). Diese Aggregation ist reversibel, d.h. eine Verdünnung der Lösung unter diese charakteristische Konzentration, die der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc) entspricht, bewirkt das Auflösen der Mizellen in einzelne Tensidmoleküle. Dabei ist die kritische Mizellbildungskonzentration abhängig von den strukturellen Eigenschaften des jeweiligen Tensids. Der cmc-Wert ist umso höher, je hydrophiler das Molekül ist. Die Messung dieses Wertes und der Ober- und

Grenzflächenspannung erfolgt mit einem Tensiometer und der Du Noüy-Ringmethode (Brezesinski und Mögel 1993). Die Oberflächenspannung von Wasser beträgt bei 20 °C etwa 72 mN/m (Lang und Trowitzsch-Kienast 2002).

Tenside werden nach Art und Ladung des hydrophilen Molekülteils in vier Gruppen eingeteilt: anionische Tenside (z.B. Alkylcarboxylate); kationische Tenside (z.B. quartäre Ammoniumverbindungen); nichtionische Tenside (z.B. Alkylglucoside) und amphotere Tenside (z.B. Betaine) (Fabry 1991).

Aufgrund der genannten Eigenschaften werden Tenside in Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzt, um zur Verbesserung der Löslichkeit von hydrophoben Schmutzpartikeln in Wasser und als Emulgator, Stabilisator oder Schaumverstärker beizutragen. Daher ergibt sich ein breites Einsatzspektrum z.B. in der Öl- und Kosmetikindustrie (Desai und Banat 1997) und bei der Produktion von Textilien, Papier, Kunststoffen, Pharmazeutika und Nahrungsmitteln (Kitamoto et al. 2002). Dabei sind die größten Hersteller Sasol, Clariant, BASF-Cognis und Shell. Die Weltjahresproduktion lag 1998 bei 10 Mio. t (Petrovic und Barcelo 2004) und 2010 bei geschätzt 14 Mio. t (Knepper und Berna 2003), wobei der Einsatz von der Textilindustrie bis zum Bergbau reicht. Ein sehr großer Anteil dessen wird nach wie vor auf der Basis fossiler Rohstoffe (z.B. Erdöl) hergestellt (Desai und Banat 1997), aber inzwischen gewinnt die Nutzung nachwachsender Rohstoffe weiter an Bedeutung. Neben der chemischen Herstellung kann diese auch durch einige Mikroorganismen erfolgen. Diese von Mikroorganismen produzierten Tenside werden Biotenside genannt und haben in den letzten Jahren an Interesse gewonnen, da diese biologisch besser abbaubar sind und eine geringere Toxizität aufweisen (Poremba et al. 1991, Lang und Trowitzsch-Kienast 2002).

## 1.2 Biotenside

Biotenside werden durch Bakterien, Hefen oder Pilze (Lang und Trowitzsch-Kienast 2002) gebildet und besitzen eine große strukturelle Diversität. Sie sind biologisch abbaubar, weitestgehend ungiftig und können unter milden Produktionsbedingungen hergestellt werden, was ihnen Vorteile gegenüber chemischen Substanzen verschafft. Daher liegen mögliche Anwendungsgebiete im Umweltbereich, z.B. im Abbau von Verunreinigungen im Boden, in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie und in der Rohölförderung (Schippers et al. 2000, Mulligan et al. 2001, Van Bogaert et al. 2007a, Pinzon und Ju 2009, Kang et al. 2010). Dabei kommen Biotenside extrazellulär oder zellgebunden vor und lassen

sich durch Extraktion isolieren. Biotenside haben einen amphiphilen Charakter und besitzen einen hydrophilen Teil, der aus Mono-, Oligo- oder Polysacchariden, Aminosäuren bzw. Peptiden oder aus Carboxylat- oder Phosphatgruppen bestehen kann, und einen hydrophoben Teil, der aus gesättigten, ungesättigten (Hydroxy-) Fettsäuren und Fettalkoholen zusammengesetzt ist. In Abhängigkeit von ihrem molekularen Aufbau sind diese in vier Hauptklassen unterteilt:

- Glycolipide (z.B.: Sophoroselipide, Mannosylerythritol-Lipide, Rhamnoselipide)
- Lipoaminosäuren und Lipopeptide (z.B.: Surfactin)
- Lipoproteine und Lipopolysaccharide (z.B.: Emulsan)
- Phospholipide, Mono- und Diglyceride, Fettsäuren

Die Gemeinsamkeiten der Biotenside liegen in ihren besonderen physicochemischen Eigenschaften, wie der Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser und der Stabilisierung von o/w-Emulsionen aufgrund ihres amphiphilen Charakters (Lang und Trowitzsch-Kienast 2002). Die größte Klasse der Biotenside bilden dabei die Glycolipide, die als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten und somit für die experimentellen Arbeiten genutzt wurden.

### **1.2.1 Glycolipide**

Glycolipide sind niedermolekulare Substanzen ( $< 1,500$  g/mol), die aus einer hydrophilen Mono-, Di- oder Oligosaccharid-Einheit bestehen und an die an einer oder mehreren Positionen esterartig oder glycosidisch langkettige hydrophobe Kohlenwasserstoffe gebunden sind (Rau et al. 2005a). Neben unterschiedlichen Zucker- und Lipidanteilen und der Bindungsart wird zwischen ionischen und ungeladenen, extrazellulären (Rhamnoselipide bei *Pseudomonas aeruginosa*) und zellwand-gebundenen (Trehaloselipide bei *Rhodococcus erythropolis*) Molekülen unterschieden. Dabei erfolgt die Überproduktion der Biotenside bei diesen Mikroorganismen insbesondere unter Limitierung der Stickstoffquelle in der stationären Wachstumsphase (Syldatk 1984). In Tabelle 1.1 ist eine Auswahl an mikrobiell produzierten Glycolipiden dargestellt.

**Tabelle 1.1: Mikrobiell produzierte Glycolipide der letzten 20 Jahre**

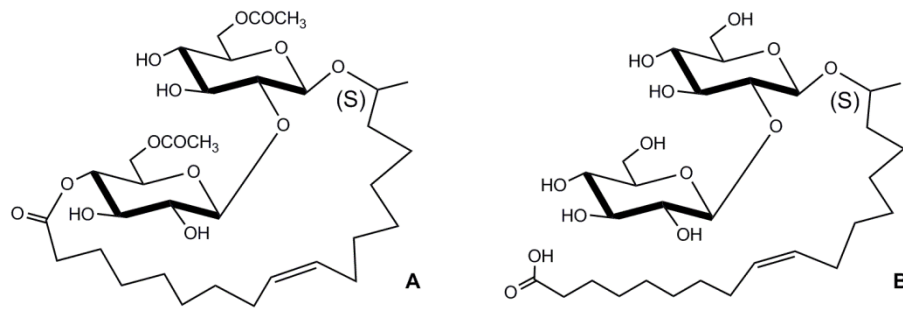
Glycolipide	Mikroorganismen	Referenz
Sophoroselipide	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	(Brakemeier et al. 1998a)
	<i>Candida apicola</i> ATCC 96134	(Hommel et al. 1994)
Mannosylerythritol-Lipide	<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 70725	(Rau et al. 2005a)
	<i>Pseudozyma aphidis</i> CBS 6821*	(Rau et al. 2005a)
	<i>Pseudozyma antarctica</i> CBS 6678**	(Rau et al. 2005a)
	<i>Ustilago maydis</i> DSM 4500	(Spoeckner et al. 1999)
Rhamnoselipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	(Müller et al. 2010)
	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 2874	(Trummel et al. 2003)
Oligosaccharidlipide	<i>Tsukamurella</i> spec. DSM 44370	(Vollbrecht et al. 1998)
	<i>T. paurometabola</i> DSM 20162	(Vollbrecht 1999)
Glycoglycerolipide	<i>Bacillus pumilus</i> AAS3	(Ramm et al. 2004)
	<i>Microbacterium</i> spec. DSM 12583	(Wicke et al. 2000)

neue Bezeichnung \* CBS 517.83 und \*\* CBS 516.83

### 1.2.1.1 Sophoroselipide

Sophoroselipide sind seit 1961 (Gorin et al. 1961) bekannt und können mit der Hefe *Candida bombicola*, früher *Torulopsis bombicola*, extrazellulär produziert werden. Das erhaltene Produkt ist ein Gemisch aus unterschiedlichen Verbindungen, die sich strukturell ähneln. Der hydrophile Teil der Sophoroselipide besteht aus dem Disaccharid Sophorose, das aus zwei  $\beta$ -1,2-verknüpften Glucose-Molekülen aufgebaut ist. An dieses ist glycosidisch eine  $\omega$ - oder ( $\omega$ -1)-monohydroxylierte Fettsäure gebunden. Diese Molekül-Komponente kann in der Kettenlänge der Hydroxyfettsäure ( $C_{15}$ - $C_{18}$ ) und ihres Sättigungsgrades (gesättigt oder ungesättigt) variieren. Der größte Anteil des Produktgemisches ist das an 6'- und 6''-Position diacetylierte Sophoroselipidlacton. In Abb. 1.2 ist ein Sophoroselipidlacton zu sehen, das durch die Kultivierung mit *C. bombicola* unter Verwendung von Glucose und Ölsäure produziert wurde (Palme et al. 2010). Als Vorstufe des Lactons existieren im Produktgemisch auch nicht-lactonisierte Sophoroside mit freier Carbonsäurefunktion (Abb. 1.2, B).





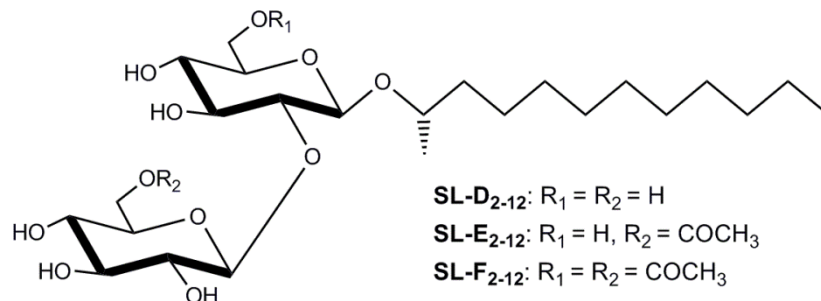
**Abb. 1.2: Struktur des Sophoroselipidlactons aus der Kultivierung mit *C. bombicola* auf Glucose und Ölsäure (A), desacetylierte Säureform (B)**

Der wahrscheinliche Biosyntheseweg zur Herstellung von Sophoroselipiden ist bei Fleurackers dargestellt (Fleurackers 2006). Demnach wird das Triglycerid durch eine sekretierte Lipase in freie Fettsäuren gespalten, welche durch die Hefe aufgenommen werden (Haba et al. 2000). NADPH, molekularer Sauerstoff und Cytochrom P450 oxidieren die Fettsäure am  $\omega$ -1-Kohlenstoff der Fettsäure, um sie für die Addition der Glucose vorzubereiten (Heinz et al. 1970). Die Schritte 3 und 4 beinhalten die Addition von zwei Glucose-Untereinheiten durch zwei verschiedene Glycosyltransferasen, die die Glucose von der Uridin-diphosphat-Glucose zur hydroxylierten Fettsäure und der Monoglucose-Fettsäure transferieren. 10-20 % dieses Reaktionsproduktes wird exkretiert und der verbleibende Teil wird an 6'- und 6''-Position mittels Acetyl-CoA acetyliert. Danach erfolgt die Umsetzung zur Lactonform durch Kopplung der Carboxyl-Gruppe an 4''-OH (Esders und Light 1972). Der letzte Schritt ist die Exkretion des diacetylierten Lactons.

Die Struktur des Glycolipidgemisches kann durch die Wahl des hydrophoben Substrats (langkettige Alkane, Alkanole, sowie Fettsäuren und deren Derivate) beeinflusst werden. Bei der Herstellung von Sophoroselipiden wurden durch Optimierung hohe Ausbeuten bis über 400 g/l (Daniel et al. 1998) erreicht und dabei mit einem Kohlenhydrat als Substrat und einem hydrophoben Co-Substrat, z.B. Triglyceride oder Fettsäuren, gearbeitet. Dabei ist das Produktgemisch auf einem breiten Substratspektrum gewinnbar. Es ist ebenfalls möglich, Reststoffe aus industriellen Prozessen zu nutzen, um die Rohstoffkosten zu reduzieren; u.a. können Abfallfette (Fleurackers 2006, Shah et al. 2007), mikrobielle Triglyceride (Daniel et al. 1999, Otto et al. 1999) und Melassen (Solaiman et al. 2007, Daverey und Pakshirajan 2009) als preiswerte Substratquelle genutzt werden.

Neben den genannten klassischen Sophoroselipiden ( $SL_{18}$ , klassisch) können mit *C. bombicola* Alkyl-Sophoroside hergestellt werden. Diese neuen Verbindungen haben eine Sophorose-Einheit, an die ein mittelkettiger Fettalkohol geknüpft ist. Bei Brakemeier 1997 wurde

*C. bombicola* auf Glucose und 2-Dodecanol kultiviert und die so entstandenen neuen Produkte sind sogenannte Dodecyl-Sophoroside (Abb. 1.3). Diese Alkyl-Sophoroside haben bessere Oberflächenaktivitäten als klassische Sophoroselipide und können die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 31 mN/m senken (Brakemeier 1997).



**Abb. 1.3:** Struktur von Alkyl-Sophorosiden aus der Kultivierung mit *C. bombicola* auf Glucose und 2-Dodecanol (Brakemeier et al. 1995)

Andere Sophorolipid-Produktgemische senken die Oberflächenspannung von Wasser auf 35 mN/m (Otto et al. 1999). Dadurch sind sie für einen Einsatz als Schaumverstärker, Emulgatoren und Stabilisatoren geeignet (Van Bogaert et al. 2007a).

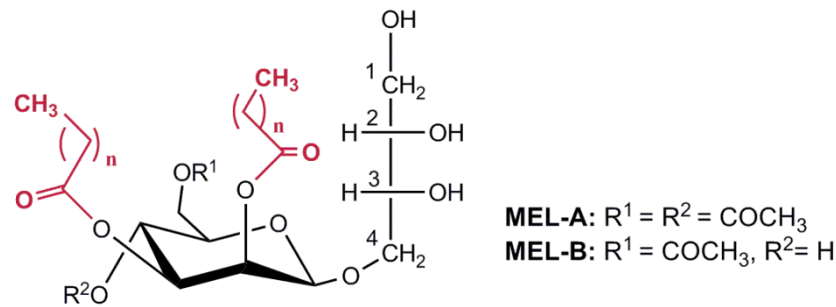
Ein weiterer Vorteil der Sophoroselipide liegt in der biologischen Abbaubarkeit und der geringen Toxizität. Damit sind diese als Reinigungsmittel sehr gut geeignet (Develter und Laurysen 2010). Weiterhin konnten biologische Aktivitäten, z.B. inhibitorische Effekte gegen die Proteinkinase C in HL60 Leukämie-Zelllinien (Isoda et al. 1997), die Induktion der Zelldifferenzierung in diesen Zelllinien (Scholz et al. 1998), Wirkung gegen HIV und Immobilisierung von Spermien (Shah et al. 2005) und die Wirkung als Immunmodulatoren für Parkinson- und Alzheimerkrankheiten (Carr und Bisht 2003) beschrieben werden. Zudem zeigten sie gute Eigenschaften bei der Behandlung von Sepsis (Bluth et al. 2006) und darüber hinaus konnte eine Wirkung gegen Pankreas-Tumorzellen (Fu et al. 2008) nachgewiesen werden. Des Weiteren tragen Sophoroselipide dazu bei, dass ölhaltige Kontaminationen durch im Boden vorhandene Mikroorganismen abgebaut werden (Schippers et al. 2000, Kang et al. 2010). Außerdem sind sie bei der Entfernung von Schwermetallen aus Böden von Nutzen (Mulligan et al. 2001). Somit ergibt sich für diese mikrobiell hergestellten Glycolipide ein breites Anwendungsspektrum, sowohl in der Waschmittelindustrie als auch in der Medizin und Bodensanierung.

In letzter Zeit erfolgte bezüglich dieser Substanzen vor allem eine Untersuchung auf genetischer Ebene, um Möglichkeiten zur genetischen Veränderung von *C. bombicola* zu finden. Es konnte u.a. das Markergen *URA3* gefunden werden (Van Bogaert et al. 2007b), um

mit diesem ein System zur Transformation und Selektion von *C. bombicola* zu entwickeln (Van Bogaert et al. 2008a). Dies ist vor allem wichtig, um Gene und Enzyme, die an der Biosynthese beteiligt sind, zu finden und zu charakterisieren, z.B. das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, welches ein Schlüsselenzym in der Glykolyse ist und dabei Energie in Form von ATP und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  bereitstellt (Van Bogaert et al. 2008b), das Gen *MFE-2*, welches an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt ist (Van Bogaert et al. 2009), sowie die Cytochrom P450-Monooxygenasen (Van Bogaert et al. 2010). Außerdem konnte beobachtet werden, dass der Fettsäure-Synthase-Komplex durch Zugabe von Cerulenin inhibiert wird, so dass keine *de novo*-Fettsäuresynthese stattfinden kann. Damit ist es möglich, das Spektrum an produzierten Sophorolipiden zu verringern und somit eine definierte Produktsynthese zu erreichen (Van Bogaert et al. 2008c). Bei der Kultivierung des Stammes, der keine  $\beta$ -Oxidation mehr betreiben kann, konnte Ähnliches erreicht werden (Fleurackers et al. 2010). Als weitere Sophorolipide-produzierende Organismen konnten u.a. die aus ölbelastetem Abwasser isolierte Hefe *Wickerhamiella domercqiae* (Chen et al. 2006) und die aus fermentierten Lebensmitteln isolierte thermophile Hefe *Pichia anomala* (Thaniyavarn et al. 2008) gefunden und charakterisiert werden.

#### 1.2.1.2 Mannosylerythritol-Lipide

Die Mannosylerythritol-Lipide (MEL) wurden zunächst 1956 bei *Ustilago maydis* entdeckt (Boothroyd et al. 1956). Später wurde der Stamm *Candida* sp., der zu *Pseudozyma* umbenannt wurde, als MEL-produzierender Mikroorganismus beschrieben (Kawashima et al. 1983), sowie zahlreiche andere Organismen, z.B. *Pseudozyma antarctica* (vormals *Candida antarctica*) (Kitamoto et al. 1990). MELs enthalten als hydrophilen Anteil das Monosaccharid Mannose, an das in C1-Position das Molekül Erythritol glycosidisch gebunden ist. Der hydrophobe Anteil wird durch gesättigte und ungesättigte Fettsäuren variabler Kettenlänge ( $\text{C}_6\text{-C}_{18}$ ) gebildet, die an den Positionen C2 und C3 gebunden sind. Eine variable Funktionalisierung mit Acetylgruppen ist an Position C4 und C6 zu finden. Daher gibt es verschiedene Ausprägungen des MEL-Moleküls, die als MEL A-D bezeichnet werden (Kitamoto et al. 1990). In Abb. 1.4 ist die Struktur der beiden MELs (MEL-A und MEL-B) dargestellt, die durch die Kultivierung mit *Pseudozyma* sp. unter Verwendung von Glucose und Sojaöl gebildet werden.



**Abb. 1.4:** Struktur von Mannosylerythritol-Lipiden aus der Kultivierung mit *Pseudozyma* sp. auf Glucose und Sojaöl;  $n = 6-12$ , gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (Fukuoka et al. 2011)

Der Biosyntheseweg der Fettsäuren für die MEL-Produktion unterscheidet sich von den drei generell bekannten Wegen für Mikroorganismen: der *de novo*-Syntheseweg (*de novo* synthesis), der Kettenverlängerungsweg (chain elongation) und der Inkorporationsweg (intact incorporation). Der neue Kettenverkürzungsweg (chain shortening pathway) ist dabei an der MEL-Biosynthese beteiligt. Die bei der Kultivierung eingesetzten hydrophoben Substrate, z.B. Fettsäuren und Fettalkohole, werden durch  $\beta$ -Oxidation in mittelkettige Fettsäuren umgesetzt. Durch Acyl- und Acetyltransferasen werden diese in die MELs eingebaut (Kitamoto et al. 2002). Untersuchungen auf genetischer Ebene wurden durch Hewald et al. durchgeführt (Hewald et al. 2006). Im ersten Schritt wird die Kondensation der Mannosyl- und Erythritol-Einheiten durch Glycosyltransferase (Emt1) katalysiert. Die Acyl- und Acetyltransferasen Mac1 und Mac2 transferieren mit Acyl-CoA als Cofaktor kurz- und mittelkettige Fettsäuren zu den Positionen 2 und 3 der Mannose. Das Enzym Acetyltransferase Mat1 acetyliert im letzten Schritt das deacetylierte MEL an Position 4 und 6 der Mannose.

Des Weiteren wurden andere Spezies der Gattung *Pseudozyma*, u.a. *P. fusiformata*, *P. parantarctica*, *P. tsukubaensis* (Fukuoka et al. 2007, Konishi et al. 2007a, Morita et al. 2009), als MEL-Produzenten beschrieben. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Produktion von MELs im Schüttelkolben- und Bioreaktormaßstab. Dabei wurden mit dem Stamm *P. aphidis* (DSM 70725) im Schüttelkolben mit Sojaöl als C-Quelle 75 g/l MEL produziert. Im Bioreaktor wurde mit der Fed-Batch-Methode mit dem Stamm *P. aphidis* (DSM 14930) 165 g/l MEL produziert (Rau et al. 2005a, Rau et al. 2005b).

Mannosylerythritol-Lipide sind aufgrund ihres amphiphilen Charakters oberflächenaktiv und senken die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 28,4 mN/m (MEL-A) bzw. 28,2 mN/m (MEL-B). Die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Tetradecan wird von 28 mN/m auf 2,1 mN/m (MEL-A) bzw. 2,4 mN/m (MEL-B) gesenkt (Kitamoto et al. 1993).

Zudem besitzen MEL-A und MEL-B antimikrobielle Aktivität gegen gram-positive Bakterien (*B. subtilis*), jedoch nur schwache Aktivität gegen gram-negative Bakterien (*E. coli*) und gegen Pilze (*A. niger*) sind sie inaktiv (Kitamoto et al. 1993). Hohe Bindungsaffinitäten zeigen MELs gegenüber Lektinen (Konishi et al. 2007b) und humanen Antikörpern (Im et al. 2003, Imura et al. 2007, Ito et al. 2007) und sind somit in der Lage mit eukaryotischen Zellen zu interagieren. In Säugerzellen können die MELs die Gentransfereffizienz erhöhen (Kitamoto et al. 2009) und das Wachstum von humanen promyelozytischen Leukämiezellen HL60 inhibieren (Kitamoto et al. 2002). MEL-A erhöht zudem die Zellassoziation und die Effizienz von Gentransfektion über Membranfusion durch kationischen Liposomen (Igarashi et al. 2006). Außerdem zeigen MELs einen guten Feuchtigkeitserhaltungseffekt, der dem von natürlichen Ceramiden entspricht. Damit könnten diese in der Herstellung von Hautcremes eingesetzt werden (Kitamoto et al. 2009). Zudem besitzen MEL-A und MEL-B ein Potenzial in der Haarpflege eine Anwendung zu finden, da gezeigt werden konnte, dass geschädigtes Haar regeneriert und eine flexiblere Haarstruktur unterstützt wird (Morita et al. 2010).

Neben den bereits genannten MEL-produzierenden Mikroorganismen der Gattungen *Pseudozyma* und *Ustilago* wurden weitere MEL-Produzenten beschrieben, wie z.B. *Schizonella melanogramma* (Dempl et al. 1980).

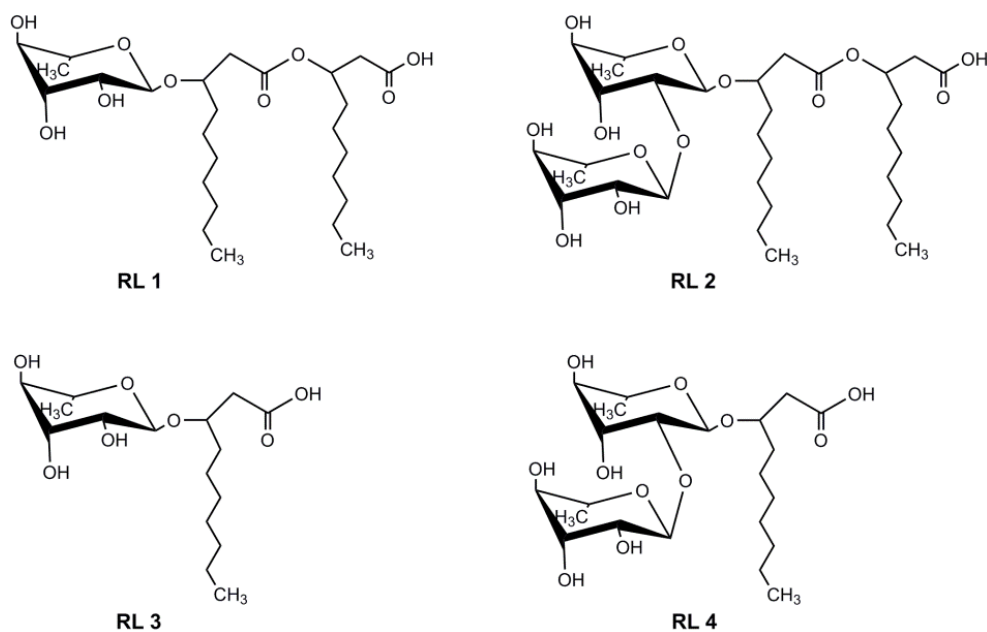
### 1.2.1.3 Weitere Glycolipide

Im Folgenden werden weitere mikrobielle Glycolipide sowie ihre physicochemischen Eigenschaften und Molekülstrukturen vorgestellt.

#### Rhamnoselipide

Rhamnoselipide wurden 1949 (Jarvis und Johnson 1949) entdeckt und können mit dem humanpathogenen gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* produziert werden. Dabei ist die Produktion durch Quorum sensing reguliert (Ochsner und Reiser 1995a) und es entsteht ein Rhamnoselipid-Gemisch, wobei dies von den verwendeten Substraten und Kultivierungsbedingungen abhängig ist. Diese anionischen Glycolipide bestehen aus einem hydrophilen Anteil mit ein oder zwei 1,2-glycosidisch verknüpften L-Rhamnose-Molekülen, an die an der C1-Position glycosidisch der hydrophobe Anteil mit ein bzw. zwei  $\beta$ -Hydroxy-Decansäuren gebunden ist. Die Struktur des ersten identifizierten Rhamnoselipids (RL 2, Abb. 1.5) wurde durch Edwards und Hayashi aufgeklärt (Edwards und Hayashi 1965). Mittlerweile können unter Verwendung von Pflanzenölen als C-Quelle und unter

Nitratlimitierung (Ramana und Karanth 1989) vier Rhamnoselipide als Hauptprodukt produziert werden (Lang und Wullbrandt 1999). Dabei handelt es sich bei RL 1 und RL 3 um ein Mono-Rhamnoselipid und bei RL 2 und RL 4 um ein Di-Rhamnoselipid (Abb. 1.5). RL 3 und RL 4 enthalten nur eine  $\beta$ -Hydroxy-Decanoyl-Einheit und werden bei der Kultivierung mit ruhenden Zellen von *Pseudomonas* sp. DSM 2874 gebildet (Syldatk et al. 1985a, Syldatk et al. 1985b). Weiterhin können ähnliche Rhamnoselipide, Rhamnoselipid A und B, mit zusätzlicher  $\alpha$ -Decensäure beschrieben werden (Yamaguchi et al. 1976). Außerdem wurden Rhamnoselipide mit kürzeren bzw. längeren Fettsäureketten beschrieben (Maier und Soberón-Chávez 2000).



**Abb. 1.5: Strukturen der Rhamnoselipide von *P. aeruginosa* (Edwards und Hayashi 1965, Syldatk et al. 1985a, Syldatk et al. 1985b)**

In der letzten Zeit konnten viele verschiedene Spezies der Gattung *Pseudomonas* als Rhamnoselipid-Produzenten identifiziert werden (Tuleva et al. 2002, Gunther et al. 2005, Monteiro et al. 2007, Oliveira et al. 2009). Im Jahr 2000 wurde schließlich das Genom von *P. aeruginosa* PAO1 entschlüsselt (Stover et al. 2000). Seither ist dieser der am besten studierte Rhamnoselipid-produzierende Stamm (Potvin et al. 2008, Williams und Cámara 2009, Müller et al. 2010).

Die Ober- und Grenzflächeneigenschaften von Rhamnoselipiden sind sehr gut. Dabei sind RL 1 und RL 2 in der Lage, die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 25 mN/m zu reduzieren (Parra et al. 1989). Des Weiteren sind Rhamnoselipide umweltfreundlich, da

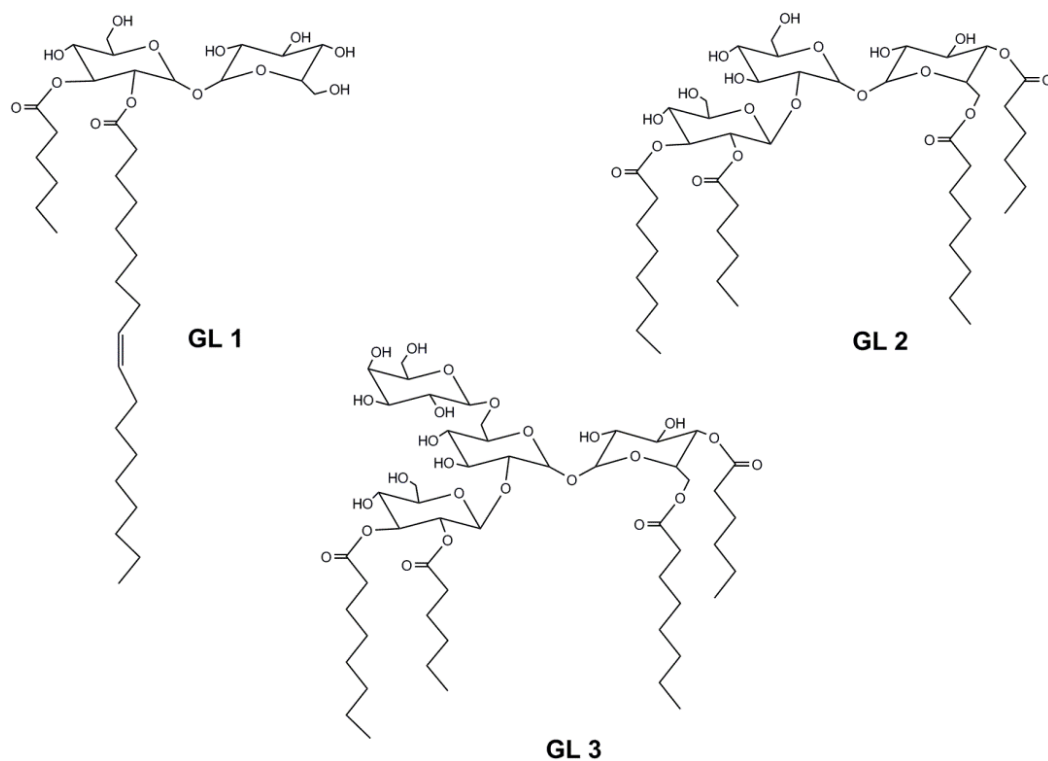
sie biologisch abbaubar sind, eine geringe Toxizität aufweisen und mittels nachwachsender Rohstoffe oder Abfallprodukte produziert werden können (Giani et al. 1997, Rahman et al. 2002, Wei et al. 2005, Marsudi et al. 2008, De Lima et al. 2009). Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie besonders für die Kosmetik, die pharmazeutische und die Reinigungsmittelindustrie interessant. Zudem wurde ihr Potenzial zur Verwendung in der biologischen Altlastensanierung (Maier und Soberón-Chávez 2000, Rahman et al. 2002, Nguyen et al. 2008), in der verbesserten Ölförderung (Wang et al. 2007) und beim biologischen Abbau von Rohöl (Zhang et al. 2005) gezeigt. Der einzige Nachteil dabei ist die Pathogenität des Produzenten *P. aeruginosa* (Risikoklasse 2), der verschiedene Krankheiten, wie z.B. Lungenentzündungen, vor allem bei immunsupprimierten Menschen, auslöst. Bisher wurden Rhamnoselipide nur in geringen Mengen in anderen heterologen Wirten (*P. fluorescens* und *P. putida*) durch die Überexpression des *rhlAB* Operons produziert (Ochsner et al. 1995b). Die Verwendung von *E. coli*-Systemen wurde angestrebt, um so die Ausbeute zu erhöhen. Dabei wurde versucht mittels Metabolic-Engineering-Ansätzen zu arbeiten (Cabrera-Valladares et al. 2006). Außerdem wurde ein Modell für die Regulation der RL-Produktion in *P. aeruginosa* erstellt, um genetische Studien auf dieser Basis durchzuführen (Ochsner et al. 1995b). Dabei wurde das *rhlAB*-Operon entdeckt, welches Strukturgene für die Produktion von Rhamnoselipiden enthält (Pearson et al. 1997).

Neben den verschiedenen Spezies der Gattung *Pseudomonas* werden Rhamnoselipide u.a. auch von *Burkholderia plantarii* DSM 9509 (Hörmann et al. 2010) gebildet.

### **Oligosaccharidlipide aus *Tsukamurella* spec.**

Der erste Oligosaccharidlipid-produzierende Bakterienstamm wurde 1941 entdeckt (Steinhaus 1941) und 1988 nach der 16S-r-RNA- Gensequenzierung als Gattung *Tskamurella* beschrieben (Collins et al. 1988). Später wurde im Rahmen eines Screenings auf Pflanzenöl-verwertende Mikroorganismen der Stamm *Tsukamurella* spec. DSM 44370 aus einer Bodenprobe isoliert (Heckmann 1995) und von der DSMZ über chemotaxonomische Merkmale und 16S-r-RNA-Gensequenzierung als *Tsukamurella* spec. nov. klassifiziert. Benannt wurde diese Gattung nach dem japanischen Mikrobiologen Michio Tsukamura. Die hier gefundenen Oligosaccharidlipide bestehen aus Di- und Oligosacchariden, die wiederum aus Trehalose bzw. Sophorose bestehen und jeweils mit einem verknüpften Glucose- oder Galactose-Molekül verbunden sind. An diesem Grundgerüst aus verschiedenen

Kohlenhydraten sind einfache Fettsäuren mit Kettenlängen von C<sub>6</sub> bis C<sub>18</sub> gebunden (Abb. 1.6), wobei die genauere Zusammensetzung von den Kultivierungsbedingungen und eingesetzten C-Quellen, beispielsweise Calendula- oder Sonnenblumenöl, abhängig ist. Diese beschriebenen Glycolipide werden insbesondere bei der Kultivierung auf Sonnenblumenöl hauptsächlich extrazellulär, aber z.T. auch zellassoziiert, gebildet (Vollbrecht 1999).



**Abb. 1.6: Strukturen verschiedener Di- und Oligosaccharidlipide bei *Tsukamurella* sp. (Langer et al. 2006)**

Die *Tsukamurella*-Glycolipide GL 2 und GL 3 sind in der Lage die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 23 bzw. 24 mN/m zu reduzieren (Vollbrecht et al. 1999).

Inzwischen wurde auch das Genom des Typstamms *T. paurometabola* (DSM 20162) entschlüsselt (Munk et al. 2011). Auf dieser Basis sind nun weitere Untersuchungen möglich, besonders mit Hinblick auf einige humanpathogene *Tsukamurella*-Arten (Jones et al. 1994, Chong et al. 1997). Außerdem wurden weitere Arten aus Bodenproben isoliert, z.B. *T. soli* sp. nov. (Weon et al. 2010).

## Glycoglycerolipide

Bereits 1995 wurde aus dem Schwamm *Halichondria panicea* das marine Bakterium *Microbacterium* spec. DSM 12583 isoliert, das neuartige mannosehaltige Glycoglycerolipide bildet (Wicke 1999, Wicke et al. 2000). Die Produktion dieser GGL konnte auf ungefähr



500 mg/l im Bioreaktor erhöht werden (Lang et al. 2004). Eine anschließende Messung der Oberflächenspannung ergab für das GGL2 einen Wert von 33 mN/m, das sich somit als gutes Biotensid herausstellte.

Der marine Stamm *B. pumilus* AAS3, der aus dem mediterranen Schwamm *Acanthella acuta* isoliert wurde, produziert ebenfalls ein Diglucoyl-Glycerolipid (GGL11) mit 14-Methyl-Hexadecansäure und 12-Methyl-Tetradecansäure als Hauptfettsäure-Einheiten (Ramm et al. 2004). Dieses GGL11 senkt die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 29 mN/m und zeigt somit gute Oberflächeneigenschaften. Die Struktur und Funktion verschiedener weiterer Glycoglycerolipide aus Bakterien oder Pflanzen werden bei Hölzl und Dörmann (Hölzl und Dörmann 2007) genauer beschrieben.

### 1.3 Modifikationen von Glycolipiden

In Hinblick auf das weltweite Umweltinteresse und die beginnende Erschöpfung der natürlichen Ressourcen kann eine steigende Bedeutung von Biotensiden in der Zukunft erwartet werden. Die Modifikationen dieser erlauben es, ihre Charakteristika zu verbessern und somit ihre Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern (Saerens et al. 2009). Zur Modifikation von Glycolipiden gibt es verschiedene Methoden, zum einen die chemische und zum anderen die enzymatische; aber auch eine Kombination dieser beiden Methoden ist möglich, um neuartige Glycolipide mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten. Dabei ist die enzymatische Modifikation selektiver als die chemische Modifikation. Fukuoka et al. strebten z.B. an, MEL-D aus dem MEL-A herzustellen. Mit alkalischer Hydrolyse hätte das bedeutet, dass sowohl die Acylgruppen als auch die Acetyl-Gruppen hydrolysieren. Dagegen gelang es ihnen schließlich, mit dem Enzym Novoyzm 435 nur die Acetyl-Gruppen aus dem Molekül abzuspalten (Fukuoka et al. 2011).

#### 1.3.1 Modifikation von Sophoroselipiden

Um die Funktionalität der Sophoroselipide zu erhöhen, wurden bisher viele verschiedene enzymatische und chemische Modifikationen an SL durchgeführt.

##### **Chemisch**

Die chemische Öffnung des Lactonrings eines klassischen Sophoroselipids (Abb. 1.2, A) wurde 1988 erreicht und anschließend eine Veresterung der freien Säuregruppe mit primären Alkoholen von C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> durchgeführt (Inoue 1988). Die anschließenden Messungen zur Oberflächenspannung ergaben vom Methyl- bis zum Decyl-Sophoroselipid zwischen 36

und 40 mN/m, was kaum einen Unterschied zum klassischen Sophoroselipid ausmacht, das bei 37 mN/m liegt (Cooper und Paddock 1984). Allerdings setzt das Myristyl-Sophoroselipid die Oberflächenspannung von Wasser nur noch auf 48 mN/m herab, d.h. es werden keine besseren Eigenschaften diesbezüglich erreicht.

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich mit der Reaktion der desacetylierten Säureform des klassischen SL in Gegenwart von N-Methyl-2-Chlor-Pyridiniumjodid und Tributylamin mit Benzyl- bzw. Decylamin zu entsprechenden Carbonsäureamiden (Ishigami et al. 1992).

Über die Katalyse mit Ammoniumchlorid werden weitere N-Alkyl- und N,N-Dialkylamide des Sophoroselipids hergestellt. Dabei entsteht z.B. das N-Butylamid des klassischen Sophoroselipids (Spöckner 1994, Lang et al. 1996).

Aus der Kultivierung von *C. bombicola* mit Ölsäure konnten bis zu 12 verschiedene Strukturen von Sophoroselipiden isoliert werden. Dabei sind die Hauptkomponenten die lactonische Form (50 % w/w) und die Säureform (25 % w/w). Um ein homogenes Startmaterial für anschließende Modifikationen zu erhalten, wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dadurch wurde eine Ringöffnung des Sophoroselipid-Lactons und die Abspaltung der Acetylgruppen erreicht und die desacetylierte Säureform des Sophoroselipids erhalten (80 % w/w). Durch die folgende saure Hydrolyse mit 2 N HCl in Dioxan bei 60 °C für 60 min im Rückfluss wurde die ( $\omega$ -1)-Hydroxyfettsäure (17-L-Hydroxyl-cis-9-Octadecensäure) gewonnen (Rau et al. 2001).

Zerkowski et al. erstellten Konjugate aus Sophoroselipiden und Aminosäuren mittels Carbodiimid-vermittelten Kopplungsmethoden, um ihre Wasserlöslichkeit zu erhöhen und um andere chemische Derivatisierungen zu ermöglichen. Die Aminosäure-Einheit ist dabei multifunktional und verfügt über einen *p*-Aminobenzoesäure-Linker. Nach dem Entfernen der Schutzgruppen von der Aminosäure am N-Terminus oder der Seitenkette wurden wasserlösliche Verbindungen mit guten Oberflächeneigenschaften (Oberflächenspannung unter 40 mN/m) erhalten (Zerkowski et al. 2006).

Fürstner et al. berichten von einer mehrstufigen Synthese des natürlichen Sophoroselipid-Lactons durch Ringschluss-Alkin-Metathese (Fürstner et al. 2000).

### **Chemisch bzw. enzymatisch**

Des Weiteren wurden chemisch bzw. enzymatisch katalysierte Modifikationen am natürlichen Sophoroselipid durchgeführt (Bisht et al. 1999, Singh et al. 2003). Die Synthese von Alkylestern, ihre regioselektive Diacylierung an 6'- und 6''-Position mit der Lipase

Novozym 435 (Bisht et al. 1999) und die Lipase-katalysierte regioselektive Acryloylierung und Copolymerisation von 6-*O*-Acryloyl-Sophorolipid-Derivaten (Bisht et al. 2000) wurden beschrieben.

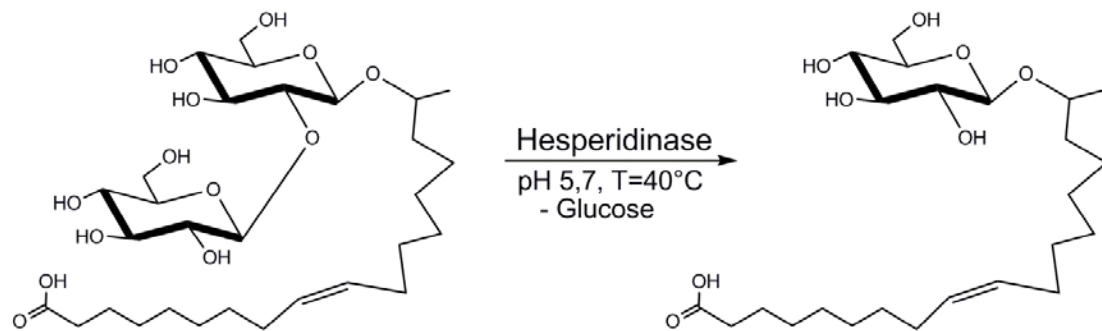
Die zuvor durch alkalische Hydrolyse erhaltene Säureform des SL wurde als Substrat für die enzymatische Modifikation mit dem Enzym Naringinase genutzt. Nach einer Reaktion für 30 h in Phosphatpuffer (pH 9) bei 40 °C wurde eine Abspaltung einer Glucose-Einheit aus dem Disaccharid Sophorose beobachtet. Dieses anionische Glucoselipid wird als Intermediat innerhalb weniger Stunden gebildet. Eine Abspaltung der zweiten Glucose-Einheit führt wenig später zur Entstehung der ( $\omega$ -1)-OH-Fettsäure (Rau et al. 2001, Hammen 2003).

Das Sophoroselipid-Lacton wurde von Nuñez et al. deacetyliert und der Ring mittels Natriummethoxid geöffnet, um den entsprechenden Methylester zu erhalten. Dieser wurde anschließend mit Vinylacetat unter Verwendung der immobilisierten Lipase Novozym 435 reacetyliert. Daraufhin erfolgte eine Transesterifikation mit 1,2-3,4-di-*O*-isopropyliden-D-Galactopyranose in Tetrahydrofuran ebenfalls mit der Lipase Novozym 435. Dieses Produkt wurde nun hydrolysiert und als Endprodukt ein Galactopyranose-Sophorolipidester erhalten (Nuñez et al. 2003, Nuñez et al. 2004).

### **Enzymatisch**

Hinsichtlich der enzymatischen Modifikationen von Sophoroselipiden wurden u.a. vier verschiedene Lipasen (Schweinepankreas-Lipase, immobilisierte *Mucor miehei* Lipase, lyophilisierte *Candida antarctica*-Lipase und lyophilisierte *Pseudomonas* sp.-Lipase) eingesetzt und dabei Isopropylether und Toluol als geeignete Lösungsmittel für eine Reaktion bei einer Temperatur zwischen 50-70 °C gefunden. Eine Lipase-vermittelte Deacetylierung und anschließende Ring-öffnende Oligomerisierung des lactonischen Sophoroselipids konnte so von Hu und Ju et al. gezeigt werden (Hu und Ju 2003).

Die Enzym-katalysierte Deacetylierung eines Sophorose-Lactons im zweiphasigen Medium unter der Verwendung einer Acetylesterase (Asmer et al. 1988) und die Umsetzung der desacetylierten Säureform des SL in ein Glucoselipid (Rau et al. 1999) mit verschiedenen Glycosidasen, z.B.  $\beta$ -Glucuronidase, Hesperidinase und Naringinase, wurde beobachtet. Dabei ist Hesperidinase das Enzym der Wahl für diese Reaktion (Abb. 1.7). Die gemessene Oberflächenspannung betrug 40 mN/m, was dem eingesetzten SL entsprach.

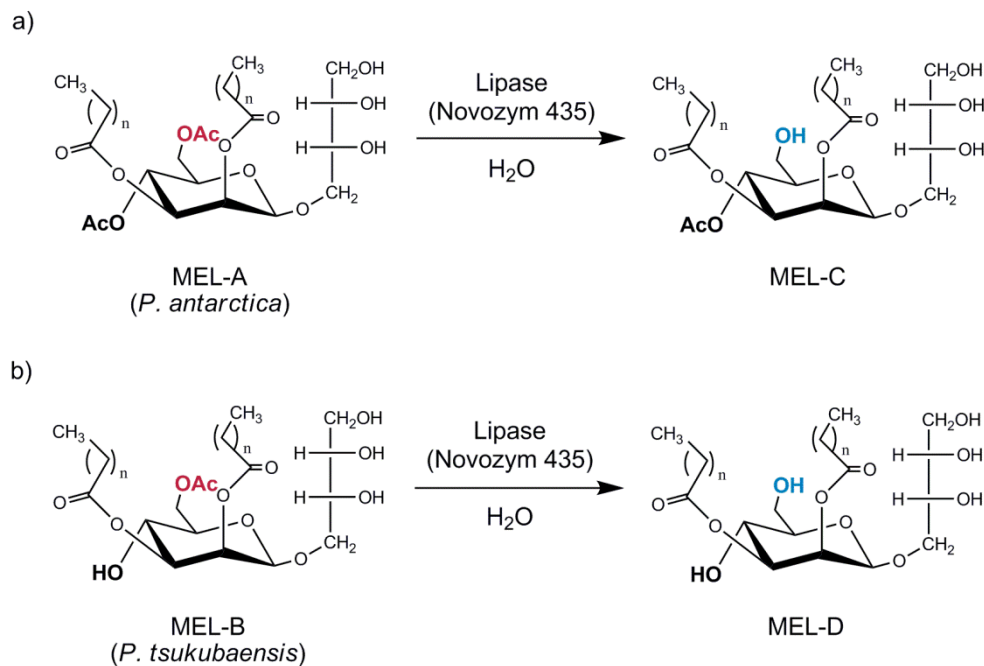


**Abb. 1.7:** Enzymatische Modifikation der desacetylierten Säureform des SL mittels Hesperidinase zum Glucoselipid (Rau et al. 1999)

Durch Lipase-katalysierte Biotransformation kommt es zur regioselektiven Acetylierungen an Position 6', 6'' oder an beiden Positionen, der Synthese von neuen Sophorolipid-Amiden und mono- und/oder diacetylierten Derivaten (Singh et al. 2003). Otto et al. erhielten bei der regioselektiven enzymatischen Deacetylierung vom diacetylierten lactonischen Sophorolipid mit Hilfe der *C. rugosa*-Lipase ein monoacetyliertes lactonisches SL (Otto et al. 1999). Die regioselektive Transesterifikation und Hydrolyse von peracetylierten SL-Derivaten mittels Lipasen wurde durch Carr und Bisht beschrieben (Carr und Bisht 2003). Die Transesterifikation findet am Methylester des Carboxylendes der 17-Hydroxy-octadecensäure-Kette, angehängt an die C1'-Position des Sophoroserings, statt. Außerdem wurde die Bildung eines Butylesters von der Reaktion mit n-Butanol, dem Enzym Novozym 435 (von *C. antarctica*) und dem Substrat Sophorolipid-Methylester beobachtet.

### 1.3.2 Modifikation von Mannosylerythritol-Lipiden

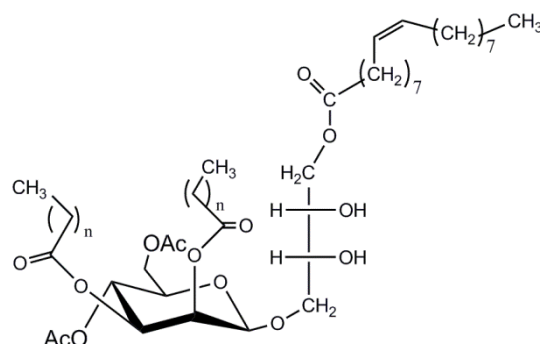
Ein Ziel der Arbeitsgruppe um Kitamoto war es, MEL-D herzustellen (Fukuoka et al. 2011). Die erste Überlegung war, dies durch alkalische Hydrolyse zu erreichen, was aber bedeutet hätte, dass die zwei Acyl-Gruppen gleichzeitig mit den Acetyl-Gruppen hydrolysieren. Daher wurde eine selektive Hydrolyse der Acetyl-Gruppen mit der Lipase Novozym 435 durchgeführt. Für diese Reaktion wurde sowohl MEL-A ( $R_4=R_6=Ac$ ) aus der Kultivierung mit *P. antarctica* als auch MEL-B aus *P. tsukubaensis* genutzt. Beim Substrat MEL-A wurde das Produkt MEL-C erhalten, welches an  $R_4$  eine Acetyl-Gruppe und an  $R_6$  nun eine Hydroxy-Gruppe enthält. Mit MEL-B ( $R_4=OH$ ,  $R_6=Ac$ ) als Substrat wurde das gewünschte Produkt MEL-D gewonnen, dass eine weitere Hydroxyl-Gruppe an  $R_6$  enthält (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8:** Schema der Lipasen-katalysierten Hydrolyse von (a) MEL-A produziert von *P. antarctica* ( $n = 6-10$ ) und (b) MEL-B produziert von *P. tsukubaensis* ( $n = 6-12$ ) (Fukuoka et al. 2011)

Damit war die Lipasen-katalysierte Hydrolyse erfolgreich und die Oberflächenspannungsmessung von MEL-D ergab 24,6 mN/m und von MEL-C 26,1 mN/m, d.h. durch die Hydrolyse wurde die Oberflächeneigenschaft der Moleküle verbessert. Nach der Strukturanalyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum konnte bewiesen werden, dass die enzymatische Hydrolyse nur die Acetyl-Gruppe betrifft und keinen Einfluss auf die Acyl-Gruppen hat.

Eine Acylierung des aufgereinigten MEL-A mit Ölsäuremethylester konnte mit dem Enzym Novozym 435 erreicht werden (Fukuoka et al. 2007). Dabei wurde die Fettsäure-Einheit direkt am Erythritol-Ende eingebracht und ergab somit ein tri-acyliertes MEL (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9:** Tri-acyliertes MEL,  $n = 6-12$  (Fukuoka et al. 2007)

### 1.3.3 Modifikation anderer Glycolipide

Auch Glycolipide, wie Rhamnoselipide oder Oligosaccharidlipide, wurden chemisch, z.B. durch alkalische Hydrolyse oder enzymatisch mittels verschiedener Enzyme verändert, um bessere Eigenschaften zu erzielen.

#### 1.3.3.1 Rhamnoselipide

Bereits 1989 wurde die Hydrolyse von Rhamnoselipiden beschrieben. Dabei wurden diese mit Schwefelsäure (1 g RL/100 ml Schwefelsäure) für 2 h bei 100 °C hydrolysiert und nach der Extraktion wurde Rhamnose erhalten (Linhardt et al. 1989).

Durch das Enzym Naringinase von *Penicillium decumbens* wurde die glycosidische Bindung zwischen zwei Rhamnose-Einheiten oder zwischen L-(+)-Rhamnose und der (*R,R*)-3-(3-hydroxydecanoyloxy)-Decansäure gespalten (Trummler et al. 2003). Mit eben diesem Enzym konnten detaillierte Untersuchungen durchgeführt werden, u.a. eine Hydrolyse des Di-Rhamnoselipids, so dass ein Mono-Rhamnoselipid und die L-(+)-Rhamnose entstanden (Magario et al. 2008b, Magario et al. 2009). In Abb. 1.10 ist diese Hydrolyse dargestellt.

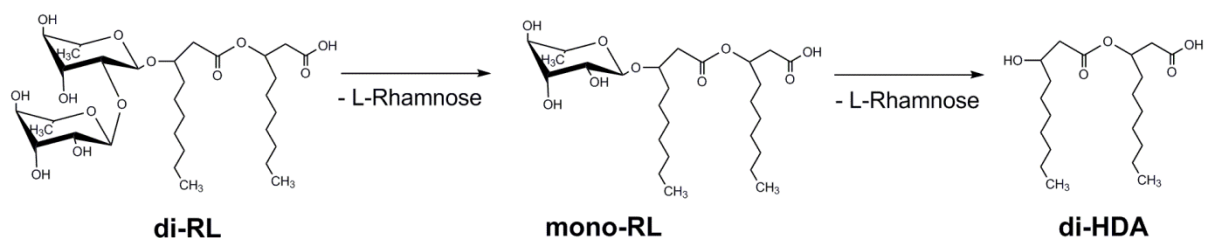


Abb. 1.10: Hydrolyse des Di- und Mono-Rhamnoselipids (Magario et al. 2008b), di-HDA = 3-(3-hydroxydecanoyloxy)-Decansäure

#### 1.3.3.2 Oligosaccharidlipide

Folgende Modifikationen wurden an diesen Molekülen (siehe Abb. 1.6) vorgenommen:

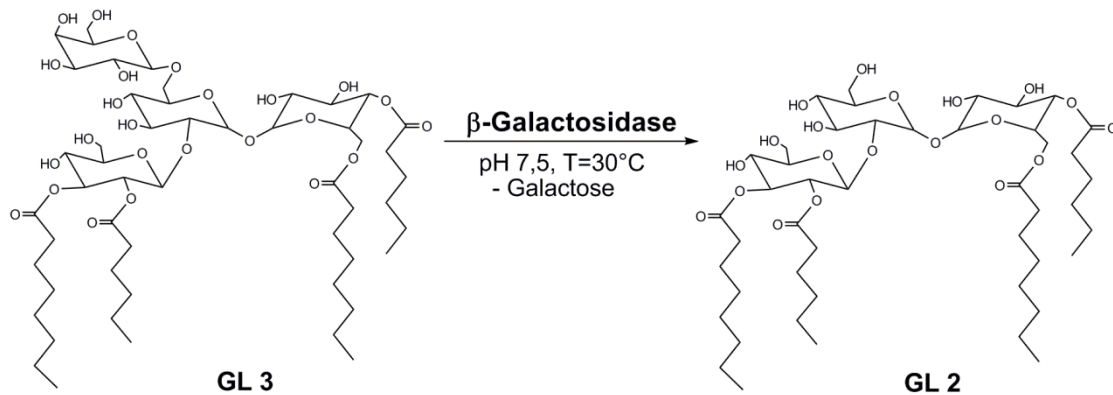
##### **Chemisch**

Die alkalische Hydrolyse der nativen Oligosaccharidlipide GL 1, GL 2 und GL 3 erfolgte mit Natriumhydroxid bei 90 °C im Rückfluss für 4 h. Damit ist es möglich, die Zuckergrundgerüste G1 (Trehalose), G2 (Trisaccharid) und G3 (Tetrasaccharid) zu erhalten (Langer 2004).

##### **Enzymatisch**

Eine enzymatisch-katalysierte Hydrolyse der Acylgruppen wurde nicht erreicht, da diese Moleküle ausschließlich sekundäre acylierte OH-Gruppen besitzen. Durch die Naringinase aus *P. decumbens* und auch durch die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* wird GL 3 enzymatisch

zu GL 2 umgewandelt und dabei eine Galactose-Einheit abgespalten, siehe Abb. 1.11 (Langer et al. 2006).



**Abb. 1.11:** Abspaltung der Galactoseeinheit vom GL 3 mittels  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (Langer et al. 2006)

Unter Verwendung organischer Lösungsmittel, hier MTBE, und dem Novozym 435 wurde eine enzymatische Acylierung des nativen GL 3 mit Ölsäure erreicht. Dabei entstehen die Produkte GL 3-Ölsäure 1 und GL 3-Ölsäure 2. Eine weitere Acylierungsreaktion wurde mit dem Zuckergrundgerüst G3 durchgeführt. Dafür wurden ebenfalls das Enzym Novozym 435 und das Reaktionsmedium MTBE/Pyridin verwendet und als Produkt G3-Ölsäure 1 gewonnen (Langer et al. 2006).

### 1.3.3.3 Glycoglycerolipide

#### Chemisch

Das Diglucosyl-Glycerolipid GGL.11 aus *B. pumilus* (AAS3) wurde einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und als Produkt das Glycoglycin GG11 erhalten (Ramm et al. 2004). Mit dem Glucosylmannosyl-Glycerolipid (GGL.2) aus *Microbacterium spec.* (DSM 12583) wurde ebenfalls eine alkalische Hydrolyse durchgeführt und das Glycoglycerin-Gerüst durch Abspaltung der Fettsäuren gewonnen (Lurtz 2006).

#### Enzymatisch

Eine enzymatische Umwandlung des GGL.11 mit der Lipase Novozym 435 unter Verwendung von wasserhaltigem tert.-Amylalkohol über ein Zwischenprodukt (GGL11.a) zum deacylierten GG11 kann ebenfalls erreicht werden (Ramm 2001). Die enzymatische Acylierung des GG11 mit 4-Pentensäure unter der Verwendung von Novozym 435 und tert.-Amylalkohol als Lösungsmittel ergab zunächst das Zwischenprodukt GGL.14 und dann das Produkt GGL.12 - ein zweifach acyliertes Glycoglycerolipid (Ramm 2001).

Eine enzymatische Hydrolyse des GGL.2 aus *Microbacterium spec.* (DSM 12583) wurde bei 60 °C für 48 h mit Novozym 435 und wasserhaltigem tert.-Amylalkohol durchgeführt. Über ein Zwischenprodukt (GGL.2.a) wurde das Hydrolysat GG2 gebildet. Die enzymatische Acylierung des GG2 mit Linolensäuremethylester (mit Novozym 435) führte zu einem neuen Produkt, dass aber nur in geringer Menge vorhanden war, so dass keine genauere Produktaufklärung möglich war (Lurtz 2006).



## 1.4 Zielsetzungen

- Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten bereits bekannte und charakterisierte Biotenside, wie z.B. die Glycolipide von *C. bombicola* (Brakemeier et al. 1998a) bzw. *Pseudozyma* spec. (Rau et al. 2005a), nachproduziert werden und als Ausgangssubstanzen für enzymatische Modifikationen dienen. Diese Substanzen waren zum einen das Alkyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> und zum anderen die Mannosylerythritol-Lipide MEL-A und MEL-B, welche in vorangegangenen Dissertationen und Publikationen u.a. als oberflächenaktiv beschrieben wurden.
- Die Molekülstrukturen dieser Ausgangssubstanzen sollten mittels Biokatalyse unter Einsatz von Glycosidasen und Lipasen gezielt verändert werden. Ein wesentlicher Schwerpunkt war, sie mit anderen ungewöhnlichen Biotensidbausteinen, z.B. der (S)-17-Hydroxy-Stearinsäure aus den klassischen Sophoroselipiden oder der (R)-3-Hydroxy-Decansäure aus den Rhamnoselipiden zu kombinieren. Für diese Grundlagenstudien sollten vorrangig Lipasen eingesetzt werden. Die neuen Produkte sollten durch Mitteldruckchromatographie aufgereinigt und anschließend mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie (MS) strukturell aufgeklärt werden.
- Die neuartigen Glycolipide sollten im Anschluss entsprechend den bisherigen Arbeiten zur mikrobiellen *de novo*-Synthese von Glycolipiden auf grundsätzliche physicochemische und biologische Eigenschaften bzw. biologischen Aktivitäten untersucht werden. Dazu zählen u.a. Messungen zur Beeinflussung der Oberflächenspannung von Wasser bzw. Studien zur Anti-Tumor-Wirkung.
- Neben der oben erwähnten Biokatalyse, die zu neuartigen Produkten führen sollte, wurde angestrebt, auch mittels mikrobieller Kultivierung von *C. bombicola* auf Glucose und 2-Tridecanon zu neuen Biotensiden zu gelangen. Ketone einer ungeradzahligen C-Kettenlänge sind in der Literatur bisher für die Herstellung erstrebenswerter 2-Tridecyl-Sophoroside nicht bekannt. Auch diese Moleküle würden mittels der zuvor genannten Methoden näher charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mikroorganismen

Zur Produktion der Ausgangssubstanzen für die spätere Modifikation wurden nachstehende Mikroorganismen verwendet (Abschnitt 2.1.1). Der darauf folgende Abschnitt listet die für den Agardiffusionstest verwendeten Mikroorganismen auf (Abschnitt 2.1.2, Tabelle 2.1).

#### 2.1.1 Mikroorganismen für Glycolipidproduktion

In den durchgeführten Untersuchungen wurde die von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville/USA) bezogene Hefe *Candida bombicola* ATCC 22214 zur Alkyl-Sophorosid-Bildung eingesetzt. Der für die Produktion von Mannosylerythritol-Lipiden genutzte Stamm war *Pseudozyma aphidis* CBS 517.83 (früher CBS 6821), der vom CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/ Netherlands) bezogen wurde.

#### 2.1.2 Mikroorganismen für Agardiffusionstests

Für diesen Test wurden verschiedene gram-negative (z.B. *E. coli*, *P. aeruginosa*) und gram-positive (z.B. *B. subtilis*, *B. megaterium*) Bakterien, Pilze und eine Alge verwendet (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen für den Agardiffusionstest**

Testorganismus	Herkunft
<b>Bakterien</b>	
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 90
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	DSM 20326
<b>Pilze</b>	
<i>Candida magnoliae</i>	DSM 70638
<i>Eurotium repens</i>	*
<i>Mycotypha microspora</i>	*
<i>Ustilago maydis</i>	DSM 4500
<b>Alge</b>	
<i>Chlorella fusca</i>	**

\* bereitgestellt durch das Institut für Mikrobiologie, Abt. Mykologie von Dr. S. Draeger (TU BS)

\*\* bereitgestellt durch das Institut für Pflanzenbiologie, Abt. Molekular-/Zellbiologie der Pflanzen (TU BS)

## 2.2 Verwendete Enzyme

Für die enzymatischen Modifikationen wurden folgende Enzyme der Tabelle 2.2 verwendet:

**Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme für die enzymatischen Modifikationen**

Enzym	Bezugsquelle
<b>Glycosidasen</b>	
$\beta$ -Mannosidase aus Jackbohnen	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
$\beta$ -Glucosidase aus Mandeln	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
$\beta$ -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<b>Lipasen</b>	
Novozym 435 immob. <i>Candida antarctica</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Lipozyme immob. aus <i>Mucor miehei</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Lipozyme IM 20 immob. aus <i>Rhizomucor miehei</i>	Novo Nordisk, Dänemark
Lipozyme IM 60 immob. aus <i>Rhizomucor miehei</i>	Novo Nordisk, Dänemark
Lipase Novo 388	Novo Nordisk, Dänemark

## 2.3 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
DC-Fertigfolien Kieselgel 60 (NP)	Macherey-Nagel, Düren
EasyVarioFlash® cartridge D31, Si 60, 40-63 $\mu\text{m}$ , 70 g LUER LOCK	Götec-Labortechnik, Bickenbach
Molekularsieb Typ 4Å	Fluka GmbH, Neu-Ulm
PTFE-Filter 0,45 $\mu\text{m}$	Sartorius Biotech GmbH, Göttingen

## 2.4 Laborgeräte und Zubehör

**Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Laborgeräte**

Gerät	Hersteller
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LD plus	Christ GmbH, Osterode am Harz
<b>MPLC</b>	
Chromatography Pump B-688	BÜCHI Labortechnik AG, Schweiz
Fraction Collector Frac-100	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Rotationsschüttelmaschine	Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Rotationsverdampfer	Heidolph, Schwabach
Vacuum Controller B-161	BÜCHI Labortechnik AG, Schweiz
Tensiometer TE1C	MWG Lauda, Königshofen
Schüttelwasserbad - Julabo SW20	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Vortex Relax 2000	Heidolph, Schwabach
Photometer U-1100	HITACHI, Tokio, Japan
Schreiber R-OX	Rikadenki, Freiburg i.Br.
Ultraschall Sonoplus	Bandelin Elektronik, Berlin
<b>MS [im HZI-BS]</b>	
Micromass QTOF 2-MS (2010)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
LTQ Orbitrap Velos (2011/2012)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
<b>NMR (1D/2D NMR-Spektrum) [im HZI-BS]</b>	
Bruker DPX 300 (SBCZ)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
ARX 400 (SBCR)	
DMX 600 (SBCE)	

## 2.5 Chemikalien

Analysenreine Mineralsalze wurden von den Firmen Fluka Feinchemikalien GmbH/Neu-Ulm, Merck/Darmstadt und Riedel de Häen/Seelze, Sigma-Aldrich GmbH/Steinheim bezogen. Darüber hinaus wurden folgende Substanzen (siehe Tabelle 2.5) als Mediumsbestandteile eingesetzt:

**Tabelle 2.5: Nährmedienkomponenten und ihre Bezugsquellen**

Substanzen	Bezugsquelle
Agar Agar	Serva, Heidelberg
Glucose* H <sub>2</sub> O	Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld
Hefe-Extrakt	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Malz-Extrakt	Merck KGaA, Darmstadt
NB-Broth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pepton	Merck KGaA, Darmstadt
YM-Broth	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Die verwendeten Lösungsmittel (Chloroform, Methanol usw.) wurden von den Firmen Fischer Scientific/UK und Carl Roth GmbH + Co. KG/Karlsruhe bezogen. In Tabelle 2.6 sind weitere Chemikalien aufgelistet, die zur experimentellen Arbeit genutzt wurden.

**Tabelle 2.6: Weitere Chemikalien und ihre Bezugsquellen**

Chemikalien	Bezugsquelle
$\alpha$ -Naphthol	Merck KGaA, Darmstadt
2-Dodecanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Decansäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kerosin (Jet A-1)*	Air BP, Hamburg
Mineralöl	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Schwefelsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Stearinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

\* bereitgestellt durch den Forschungsflughafen Braunschweig GmbH

## 2.6 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck 20 min im Autoklaven sterilisiert.

### 2.6.1 Agarmedien

**Tabelle 2.7: YM 1-Agar für Stammhaltung von *C. bombicola***

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
YM-Broth	21
Agar	20

**Tabelle 2.8: YM 2-Agar für Stammhaltung von *P. aphidis***

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
Hefe-Extrakt	3
Malz-Extrakt	3
Pepton	5
Glucose	10
Agar	15

**Tabelle 2.9: NB-Agar für Stammhaltung und Agardiffusionstests**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
NB-Broth	8
Agar	20

**Tabelle 2.10: MPY-Agar für Stammhaltung und Agardiffusionstests**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
Hefe-Extrakt	2,5
Malz-Extrakt	20
Pepton	2,5
Agar	18

**Tabelle 2.11: CB-Agar für *Chlorella fusca* (Wicke 1999)**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
Hefe-Extrakt	10
Glucose	10
Agar	18

### 2.6.2 Vorkulturmedien

Für die Vorkultur im Schüttelkolbenmaßstab (500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Kultur) wurde für *P. aphidis* das Medium SC1 (Tabelle 2.12) genutzt. Als Vorkulturmedium (YM1) für *C. bombicola* wurde 21 g l<sup>-1</sup> YM-Broth eingesetzt.

**Tabelle 2.12: Vorkulturmedium (SC1) für *P. aphidis* (Rau et al. 2005a)**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
Glucose	60
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
Hefe-Extrakt	1

Der pH-Wert sollte bei pH 6 liegen, aber nicht eingestellt werden.

### 2.6.3 Hauptkulturmedien

Hauptkulturen im Schüttelkolbenmaßstab (2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml Kultur) wurden unter Verwendung von Medien der Tabellen 2.13 und 2.14 durchgeführt:

**Tabelle 2.13: Hauptkulturmedium für *C. bombicola* (Fiehler 1994)**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
1) Glucose*H <sub>2</sub> O	100
2) Hefe-Extrakt	1
Natriumcitrat*2H <sub>2</sub> O	4,7
NH <sub>4</sub> Cl	1,54
3) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,16
4) MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,7
NaCl	0,5
5) CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,16

Die Substanzen wurden mit 100 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und einzeln (1 bis 5) angesetzt, um zu verhindern, dass die Salze nach dem Autoklavieren ausfallen.

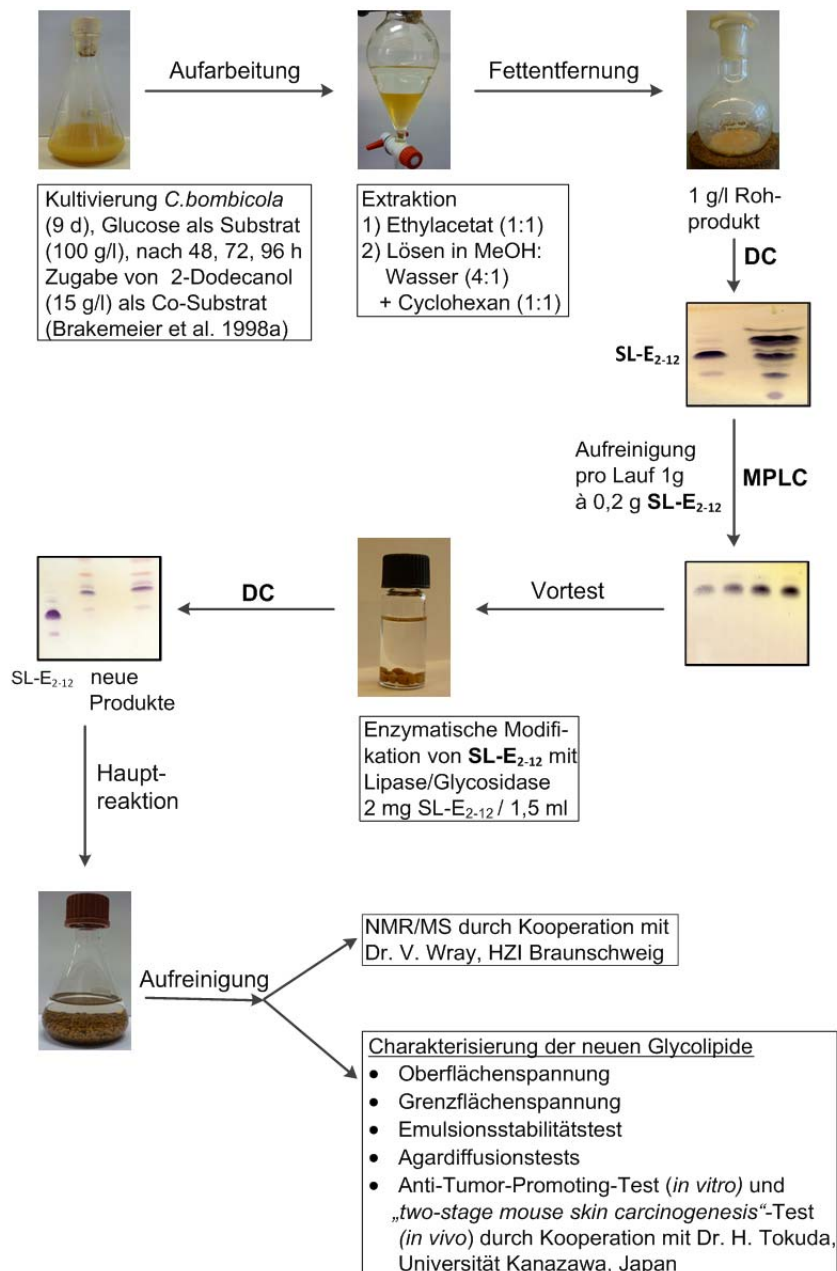
**Tabelle 2.14: Hauptkulturmedium A für *P. aphidis* (Rau et al. 2005a)**

Bestandteile	Menge (g l <sup>-1</sup> )
Sojaöl	80
NaNO <sub>3</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,2
Hefe-Extrakt	1

Der pH-Wert sollte bei pH 6 liegen, aber nicht eingestellt werden.

## 2.7 Workflow

Im Folgenden wird beispielhaft für alle mikrobiellen Kultivierungen und Biokatalysen der Versuchsablauf für die Bearbeitung des Projektteils mit SL-E<sub>2-12</sub> als Ausgangssubstanz dargestellt (Abb. 2.1). Für die Bearbeitung der MELs erfolgte dies in ähnlicher Weise. Dabei werden die einzelnen Teilschritte in den weiteren Kapiteln genauer erläutert.



**Abb. 2.1:** Workflow des Versuchsablaufs für die Kultivierung, Aufreinigung, Modifikation von SL-E<sub>2-12</sub> und der folgenden Charakterisierung der neuen Glycolipide



## **2.8 Kultivierung von *Candida bombicola* mit 2-Dodecanol als Co-Substrat**

### **2.8.1 Stammhaltung**

Zur Stammhaltung von *Candida bombicola* ATCC 22214 wurden Agarplatten mit YM-Broth-Agar verwendet. Der Stamm wurde alle 4 Wochen auf neue Agarplatten überimpft, für 48 h bei 27 °C inkubiert, luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert (Brakemeier et al. 1998a).

### **2.8.2 Vorkultur**

Für die Vorkulturen wurden zur Anzucht von Biomasse, Zellen von einer Agarplatte auf 100 ml steriles Vorkulturmedium (YM1) überimpft und in einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen für 48 h-72 h bei 30 °C und 100 rpm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Firma Braun Biotech International GmbH, Melsungen) inkubiert.

### **2.8.3 Hauptkultur**

Die Hauptkultivierungen erfolgten in 2 l Schüttelkolben mit zwei Schikanen, die 500 ml Fiehler-Medium enthielten. Als Inokulum wurden jeweils 10 % (v/v) Vorkultursuspension eingesetzt und bei 30 °C und 100 rpm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Firma Braun Biotech International GmbH, Melsungen) inkubiert. Eine Zudosage von 2-Dodecanol als Co-Substrat erfolgte nach 48, 72 und 96 h mit jeweils 5 g/l. Nach 9 Tagen wurde die Kultivierung beendet und aufgearbeitet (Brakemeier et al. 1998a).

### **2.8.4 Aufarbeitung und Isolierung der 2-Dodecyl-Sophoroside**

Nach Kultivierungsende wurde die Kultursuspension zweimal mit Ethylacetat im Verhältnis 1:1 mittels Scheidetrichter ausgeschüttelt und zunächst gefriergetrocknet. Anschließend wurde dieses Rohprodukt in Methanol:Wasser (4:1) gelöst und zweimal mit Cyclohexan im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt. Die entstehende obere Phase (Cyclohexan + Methanol) enthielt restliches 2-Dodecanol und die untere Phase (Methanol + Wasser) das SL-Rohprodukt. Die untere Phase wurde danach gefriergetrocknet und eine DC-Analyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob noch Fettanteile (Alkohole, Säuren) enthalten sind. Lag noch eine Fettverunreinigung vor, wurde das SL-Rohprodukt erneut in Methanol:Wasser (4:1) gelöst und zweimal mit Cyclohexan im Verhältnis 1:1

ausgeschüttelt. Wenn kein Überschuss an Fettkomponenten mehr vorhanden war, konnte das SL-Rohprodukt zu weiteren Versuchen und der Trennung über die Mitteldruckchromatographie (MPLC) genutzt werden (siehe Abschnitt 2.11).

## **2.9 Kultivierung von *Candida bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat**

Sowohl die Stammhaltung als auch die Vorkultur und Hauptkultur wurden genau wie die Kultivierung mit 2-Dodecanol durchgeführt (Abschnitt 2.8) und anschließend nach dem gleichen Aufarbeitungsschema, wie für die 2-Dodecanol-Kultivierung, bearbeitet (Abschnitt 2.8.4). Nach der Trennung mittels MPLC wurden neuartige Glycolipidkomponenten erwartet.

## **2.10 Kultivierung von *Pseudozyma aphidis***

### **2.10.1 Stammhaltung**

Zur Stammhaltung von *Pseudozyma aphidis* CBS 517.83 (früher CBS 6821) wurden Agarplatten mit YM2-Agar verwendet. Alle 4 Wochen wurde der Stamm auf neue Agarplatten überimpft, für 72 h bei 30 °C inkubiert, luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert (Rau et al. 2005a).

### **2.10.2 Vorkultur**

Für die Vorkulturen wurden zur Biomasseanzucht Zellen von einer Agarplatte in 100 ml steriles Vorkulturmedium (YM2) überimpft und in einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen für 48 h-72 h bei 30 °C und 100 rpm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Firma Braun Biotech International GmbH, Melsungen) inkubiert.

### **2.10.3 Hauptkultur**

Die Hauptkultivierungen erfolgten in 500 ml Schüttelkolben mit zwei Schikanen, die 100 ml Hauptmedium A enthielten. Als Inokulum wurden jeweils 10 % (v/v) Vorkultursuspension eingesetzt, die entsprechende Menge Sojaöl direkt zugeben und bei 30 °C und 100 rpm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Firma Braun Biotech International GmbH, Melsungen) inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Kultivierung beendet und aufgearbeitet (Rau et al. 2005a).

#### **2.10.4 Aufarbeitung und Isolierung der Mannosylerythritol-Lipide**

Nach Kultivierungsende wurde die Kultursuspension zwei- bis dreimal mit MTBE im Verhältnis 1:1 mittels Scheidetrichter ausgeschüttelt und zunächst gefriergetrocknet. Anschließend wurde dieses Produkt in Methanol:Wasser (4:1) gelöst und zweimal mit Cyclohexan im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt. Die entstehende organische Phase enthielt restliches Sojaöl und die wässrige Phase das MEL-Rohprodukt, welches wieder gefriergetrocknet wurde. Danach wurde eine DC-Analyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob noch Fettsäureanteile enthalten sind. Sollte noch eine Fettsäureverunreinigung vorliegen, wurde das MEL-Rohprodukt erneut in Methanol:Wasser (4:1) gelöst und zweimal mit Cyclohexan im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt. Wenn keine Verunreinigungen mehr vorhanden waren, konnte das MEL-Rohprodukt zu weiteren Versuchen und der Trennung über die MPLC genutzt werden (siehe Abschnitt 2.11).

#### **2.11 Trennung der verschiedenen Glycolipidkomponenten mittels MPLC**

Die Isolierung einzelner Komponenten aus den erhaltenen Glycolipid-Rohextrakten erfolgte mittels Mitteldruckchromatographie (MPLC). Dazu wurde eine MPLC-Anlage, bestehend aus der Säuleneinheit EasyVarioFlash® D31, Si 60 (40-63 µm) (Götec-Labortechnik GmbH, Bickenbach), dem Fraktionssammler Frac-100 (Pharmacia, Uppsala/Schweden) und der Chromatographie-Pumpe, Modell 681 (Büchi Labortechnik AG, Schweiz), verwendet. Für die Trennung des Glycolipidgemisches in seine Einzelkomponenten wurde je 1 g Glycolipid-Rohextrakt genutzt, welcher in 5 ml eingesetztem Laufmittel [Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2) für Alkyl-Sophoroside bzw. für die MELs (65:10:2)] gelöst und für die Abtrennung von Schwebstoffen gefiltert (PTFE-Filter) wurde. Dabei war der Säulenvordruck zwischen 4 und 6 bar und die Flussrate lag zwischen 4 ml/min, wobei die Fraktionsgröße 2 ml betrug. Von jeder fünften Fraktion wurden 10 µl auf eine DC-Platte (Fertigfolien Kieselgel 60, Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen und im gleichen Laufmittel entwickelt. Anschließend erfolgte die Benetzung mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure (siehe Abschnitt 2.13.1). Durch die Erhitzung der DC-Platte auf einer Heizplatte konnten die lila gefärbten Banden sichtbar gemacht werden. Die Fraktionen mit gleichem Inhalt wurden vereinigt und das

Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde die Reinheit der gewonnenen Fraktionen nochmals mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

### 2.12 Enzymatische Methoden zur Modifikation der Glycolipide

In dieser Arbeit wurden zahlreiche Modifikationsversuche mit verschiedenen Enzymen (Tabelle 2.2) an den durch Mikroorganismen produzierten Glycolipiden durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Ansätze beschrieben, die neue Glycokonjugate lieferten und mit denen weiterführende Untersuchungen z.B. zur Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser gemacht wurden. Die Ansätze wurden dabei in 100 ml Erlenmeyerkolben, die mit einer PTFE-Dichtung verschlossen waren, im Schüttelwasserbad bei den jeweiligen ermittelten Temperaturoptima und einer Schüttelfrequenz von 100 rpm inkubiert.

#### 2.12.1 Modifikation der 2-Dodecyl-Sophoroside

Um zu den Idealbedingungen für die Modifikation von Alkyl-Sophorosiden zu gelangen und somit zu neuen Glycokonjugaten, wurden im Vorfeld viele Studien u.a. zum optimalen Enzym und dem optimalen Verhältnis Enzym und Substrat durchgeführt. In den folgenden Abschnitten sind die Standardansätze dargestellt. Eine genauere Beschreibung und Variationen der Ansätze sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle gegeben.

##### 2.12.1.1 Glycosidase-katalysierte Reaktion zur Glucose-Abspaltung

Der Standardansatz (Tabelle 2.15) für die Glucosidase-katalysierte Glucose-Abspaltung mit dem Enzym  $\beta$ -Glucuronidase erfolgte bei 37 °C für eine Zeit von 30-36 h im Schüttelwasserbad bei 100 rpm.

**Tabelle 2.15: Standardansatz der Glycosidase-katalysierten Glucose-Abspaltung**

Reaktionskomponenten	Eingesetzte Mengen
SL-E <sub>2-12</sub>	50 mg
$\beta$ -Glucuronidase aus <i>H. pomatia</i>	50 $\mu$ l (+ 50 $\mu$ l nach jeweils 12 h und 24 h)
Lösungsmittel: Phosphatpuffer nach Sørensen, 1 M (Dawson et al. 1969)	5 ml (pH 8)

Nach der Reaktion wurde das neue Produkt von den Nebenprodukten durch Trennung mittels MPLC isoliert und stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

### 2.12.1.2 Lipase-katalysierte Acylierungen

Der Standardansatz für die Lipase-katalysierte Acylierung wurde bei 75 °C für 48-72 h im Schüttelwasserbad bei 100 rpm durchgeführt (Tabelle 2.16).

**Tabelle 2.16: Standardansatz der Lipase-katalysierten Acylierung**

Reaktionskomponenten	Eingesetzte Mengen
SL-E <sub>2-12</sub>	50 mg
Lipasen (Tabelle 2.2)	100 mg
Fettsäure	100 mg
Lösungsmittel: Toluol	25 ml
Trocknungsmittel: aktiviertes Molsieb	4 g

Als Fettsäurekomponenten wurden sowohl Decansäure und Stearinsäure als auch die ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-Decansäure (aus Rhamnoselipiden) und 17-OH-Stearinsäure (aus klassischen Sophoroselipiden; produziert auf Glucose/Ölsäure (Steffen 1994)) verwendet. Die ungewöhnlichen Komponenten wurden aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Lang erhalten.

Nach Reaktionsende wurden die immobilisierte Lipase und das Trocknungsmittel über einen Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit dem Lösungsmittel Toluol gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer abgezogen, die erhaltene Substanz im geeigneten Lösungsmittel (Chloroform:Methanol:Wasser - 65:15:2) aufgenommen, über die MPLC von Nebenprodukten getrennt und somit aufgereinigt. Das neue Glycokonjugat stand danach für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

### 2.12.1.3 Lipase-katalysierte Acylierung mit Sebacinsäure

Dieser Ansatz für die Lipase-katalysierte Acylierung wurde bei 65 °C für 48 h im Schüttelwasserbad bei 100 rpm durchgeführt (Tabelle 2.17). Als Substrat für die Reaktion wurde das zuvor aus der enzymatischen Modifikation, der Glycosidase-katalysierten Reaktion zur Glucose-Abspaltung (Abschnitt 2.12.1.1), erhaltene Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> eingesetzt. Bei der verwendeten Fettsäure handelt es sich um Sebacinsäure.

**Tabelle 2.17: Standardansatz der Lipase-katalysierten Acylierung**

Reaktionskomponenten	Eingesetzte Mengen
GL-A <sub>12</sub>	50 mg
Lipasen (Tabelle 2.2)	100 mg
Fettsäure: Sebacinsäure	50 mg
Lösungsmittel: Toluol	30 ml
Trocknungsmittel: aktiviertes Molsieb	4 g

Nach der Reaktionszeit wurde mit den Proben genau so verfahren, wie bei den vorangegangenen Ansätzen.

## 2.12.2 Modifikation der Mannosylerythritol-Lipide

Für die folgenden verschiedenen Versuche zur Modifikation der Mannosylerythritol-Lipide zu neuen Glycokonjugaten wurden im Vorfeld viele Testreihen u.a. zum optimalen Enzym und dem optimalen Verhältnis Enzym und Substrat durchgeführt. Im Folgenden werden die Standardansätze dargestellt. Eine genauere Beschreibung und mögliche Variationen der Ansätze werden im Ergebnisteil an entsprechender Stelle gegeben.

### 2.12.2.1 Lipase-katalysierte Acylierungen

Der Standardansatz für die Lipase-katalysierte Acylierung erfolgte bei 60 °C bzw. 70 °C über einen Zeitraum von 48 h im Schüttelwasserbad bei 100 rpm (Tabelle 2.18).

**Tabelle 2.18: Standardansatz der Lipase-katalysierten Acylierung**

Reaktionskomponenten	Eingesetzte Mengen
MEL-A oder MEL-B	150 mg
Lipasen (Tabelle 2.2)	200 mg
Fettsäure	150 mg
Lösungsmittel: Toluol	40 ml
Trocknungsmittel: aktiviertes Molsieb	4 g

Als Fettsäurekomponenten wurden die ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-Decansäure (aus Rhamnoselipiden) und 17-OH-Stearinsäure (aus Sophoroselipiden) verwendet. Diese Komponenten wurden aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Lang erhalten. Nach Reaktionsende wurden die immobilisierte Lipase und das Trocknungsmittel über einen Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit dem Lösungsmittel Toluol gewaschen.

Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer abgezogen, die erhaltene Substanz im geeigneten Lösungsmittel (Chloroform:Methanol:Wasser- 65:10:2) aufgenommen, über die MPLC von Beiprodukten getrennt und somit aufgereinigt. Die neuen Glycokonjugate standen danach für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

## 2.13 Analytische Methoden

Um die neu entstandenen Produkte aus den beschriebenen Modifikationen sichtbar zu machen, wurde vor allem die Dünnschichtchromatographie genutzt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der neuen Produkte in größeren mg-Mengen mittels MPLC (siehe Abschnitt 2.11). Die Strukturen der neuen Produkte wurden danach mittels NMR/MS-Analysen aufgeklärt, wie im Folgenden beschrieben.

### 2.13.1 Dünnschichtchromatographie

Für die qualitative Dünnschichtchromatographie der Dodecyl-Sophorose wurden mit Kieselgel beschichtete Alufolien (Schichtdicke 0,2 mm, Normalphase) als stationäre Phase verwendet, die in folgendem Laufmittel entwickelt wurden, Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2) (v/v/v). Für die Mannosylerythritol-Lipide wurde hingegen das Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:10:2) (v/v/v) gewählt, da dieses eine bessere Trennung der Substanzen bewirkte.

Zur optischen Detektion der Glycolipide wurden die Dünnschichtchromatogramme mit folgendem Sprühreagenz (Tabelle 2.19) besprüht und bei ca. 120 °C auf einer Heizplatte entwickelt. Dabei werden Zucker und zuckerhaltige Verbindungen rosa-violett angefärbt.

**Tabelle 2.19: Bestandteile des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure (Stahl 1967)**

Bestandteile	Menge (ml)
$\alpha$ -Naphthollösung (15 % in Ethanol)	10,5
Dest. Wasser	4
Ethanol	40,5
Konz. Schwefelsäure	6,5

### **2.13.2 Strukturaufklärung der Glycolipide**

Die Strukturaufklärung und die anschließende Interpretation der aufgenommenen Spektren erfolgten in Kooperation mit Dr. Victor Wray vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsbiologie in Braunschweig.

#### **2.13.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, sowie COSY (CORrelation SpectroscopY)-NMR-Spektren, wurden mittels Bruker DPX 300 (SBCZ), ARX 400 (SBCR) und DMX 600 (SBCD) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) und  $\text{CD}_3\text{OD}$  oder  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) als deuteriertes Lösungsmittel aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde auf die Resonanz von Tetramethylsilan (TMS) bezogen.

#### **2.13.2.2 Massenspektrometrie**

Die MS-Spektren wurden mit dem Massenspektrometer Micromass QTOF 2-MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) bzw. dem LTQ Qorbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) gemessen. Dabei wurden ESI (Electron Spray Ionization) und HRESI (High Resolution Electron Spray Ionization) Massenspektren erstellt.

### **2.14 Physicochemische Methoden**

Alle Ausgangssubstanzen für die enzymatischen Modifikationen und auch die neuen Glycokonjugate wurden durch die Messung der Ober- und Grenzflächenspannung und durch ihre emulsionsstabilisierende Wirkung charakterisiert.

#### **2.14.1 Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser**

Für die Messung der Oberflächenspannung von Wasser unter Einfluss der Ausgangssubstanzen und der neu erhaltenen Produkte wurde ein Tensiometer (Lauda TE1C, MWG Lauda, Königshofen) verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25 °C mit Hilfe der Ringmethode ohne Abriss nach Lecomte du Noüy (Adamson 1982). Bei dieser Methode wird in die Messlösung ein Platin-Iridium-Messring 5 mm unter die Flüssigkeitsoberfläche getaucht. Anschließend wird der Ring aus der Flüssigkeitsoberfläche gezogen. Ein Kraftaufnehmer registriert automatisch das Maximum der durch die am Ring anheftende Flüssigkeitslamelle ausgeübten Kraft. Vor Abriss dieser Lamelle senkt das Gerät den Ring vollständig in die Messlösung zurück ab. Das Maximum



ist entsprechend abhängig von der Oberflächenspannung der gemessenen Probe. Die Aufzeichnung der Messungen erfolgt durch einen Messschreiber. Dabei wird durch wiederholtes Anheben und Absenken des Rings bis zur Konstanz des Messwertes gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden anschließend noch mit Hilfe des Korrekturfaktors angeglichen, der das Gewicht der vom Ring angehobenen Flüssigkeit berücksichtigt (Harkins und Jordan 1930). Im Vorfeld der Messung wurde das Gerät mittels Eichgewicht kalibriert. Die Proben bestanden aus 20 ml bidestilliertem Wasser und 1 bis 240 µl der Substanzlösung (0,5 mg/l bis 120 mg/l in Dichlormethan gelöst). Zum Verdampfen des Dichlormethans und zur Homogenisierung der wässrigen Phase wurden die Proben 3 x 1 min mit einem Ultraschallgerät (Sonoplus, Bandelin Elektronik, Berlin) beschallt.

Die Oberflächenspannung ergibt sich nach Lecomte du Noüy (Harkins und Jordan 1930):

$$\sigma_1 = \frac{P}{4\pi \cdot R} \cdot F = \frac{m \cdot g}{4\pi \cdot R} \cdot F$$

mit	$\sigma_1$	-	Oberflächenspannung der Flüssigkeit	[mN/m]
	P	-	maximale Kraft beim Herausziehen des Ringes	[N]
	R	-	Radius des Ringes	[cm]
	m	-	Masse der hochgezogenen Flüssigkeit	[g]
	g	-	Erdbeschleunigung	[cm/s <sup>2</sup> ]
	F	-	Korrekturfaktor	[-]

### 2.14.2 Bestimmung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan

Die Grenzflächenspannung eines Wasser/n-Hexadecan-Systems wurde, genau wie die Oberflächenspannung, mittels Tensiometer (Lauda TE1C, MWG Lauda, Königshofen) mit Hilfe der Ringmethode ohne Abriss nach Lecomte de Noüy (Adamson 1982) bei einer Temperatur von 25 °C gemessen. Zur Messung der Grenzflächenspannung  $\gamma$  wurden die Proben, wie für die Oberflächenspannungsmessung vorbereitet, anschließend mit 10 ml n-Hexadecan überschichtet und ebenfalls bis zur Gleichgewichtseinstellung vermessen. Zudem wurden die erhaltenen Messwerte ebenso, wie die Oberflächenspannungsmesswerte, noch mit Hilfe des Korrekturfaktors angeglichen.

### 2.14.3 Bestimmung der Emulsionsstabilität

Die Emulsionsstabilität der bekannten und modifizierten Glycolipide wurde mittels Photometer durch Messung der optischen Dichte bei 623 nm über den Zeitraum von 4 h

gemessen und dokumentiert (Schulz 1992, Vollbrecht 1999, Ramm 2001). Dafür wurde sowohl eine o/w-Emulsion als auch eine w/o-Emulsion verwendet (Tabelle 2.20).

**Tabelle 2.20: Bestandteile der o/w-Emulsion und w/o-Emulsion**

	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>o/w-Emulsion</b>	Wasser	4 ml
	Hydrophobe Phase	100 µl
	Tensid	2 mg
<b>w/o-Emulsion</b>	Wasser	100 µl
	Hydrophobe Phase	4 ml
	Tensid	2 mg

Als hydrophobe Phase wurden alternativ Hexadecan, Kerosin, Mineralöl und Sonnenblumenöl genutzt und die Tensidmenge entsprach dabei 0,125 g/l. Die Phasen wurden anschließend eine Minute mittels Vortex auf höchster Stufe durchmischt und sofort durch ein Photometer (HITACHI, Tokio, Japan), was an einem Schreiber (Rikadenki, Freiburg i.Br.) angeschlossen war, über 4 h vermessen.

## 2.15 Untersuchung von biologischen Aktivitäten

Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch die Bestimmung der biologischen Aktivität der Ausgangssubstanzen und der resultierenden Produkte aus den enzymatischen Modifikationen. Dazu wurde ein Agardiffusionstest mit verschiedenen Bakterien, Pilzen und einer Alge durchgeführt. Des Weiteren erfolgte ein *in vitro*- und ein *in vivo*-Test, welche durch Dr. H. Tokuda von der Kanazawa Universität in Japan durchgeführt wurden.

### 2.15.1 Agardiffusionstest

Um die Wirkung der isolierten und modifizierten Glycolipide auf u.a. Bakterien und Pilze (Tabelle 2.1) zu testen, wurde mit dem Plättchentest [DIN 58940] gearbeitet. Auf einer Agarplatte wurden jeweils 100 µl Kulturüberstand einer Bakterien- oder Pilz-Übernachtskultur ausplattiert, anschließend die sterilen Testplättchen (6 mm Rundfilter) mit in DMSO gelösten Glycolipiden in verschiedener Konzentration (0-600 µg pro Plättchen) aufgelegt und für 2 h im Kühlschrank gelagert, damit die Substanzen die Möglichkeit haben in den Agar zu diffundieren. Danach wurden die Platten bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert und nach entsprechender Inkubationszeit die

Wachstumshemmung um das Plättchen ausgewertet (Langer 2004). Als Vergleichssubstanz wurde Penicillin G aufgetragen.

**Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen für den Agardiffusionstest**

Testorganismus	Herkunft	Medium	Inkubations- temperatur	Inkubations- dauer
<b>Bakterien</b>				
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 90	NB	30 °C	24 h
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347	NB	30 °C	24 h
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	NB	30 °C	24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	NB	30 °C	24 h
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	DSM 20326	YM 2	30 °C	24 h
<b>Pilze</b>				
<i>Candida magnoliae</i>	DSM 70638	YM 2	27 °C	24 h
<i>Eurotium repens</i>	*	MPY	27 °C	48 h
<i>Mycotypha microspora</i>	*	MPY	27 °C	48 h
<i>Ustilago maydis</i>	DSM 4500	MPY	27 °C	48 h
<b>Alge</b>				
<i>Chlorella fusca</i>	**	CB	25 °C	48-72 h

\* bereitgestellt durch das Institut für Mikrobiologie, Abt. Mykologie von Dr. S. Draeger (TU BS)

\*\* bereitgestellt durch das Institut für Pflanzenbiologie, Abt. Molekular-/Zellbiologie der Pflanzen (TU BS)

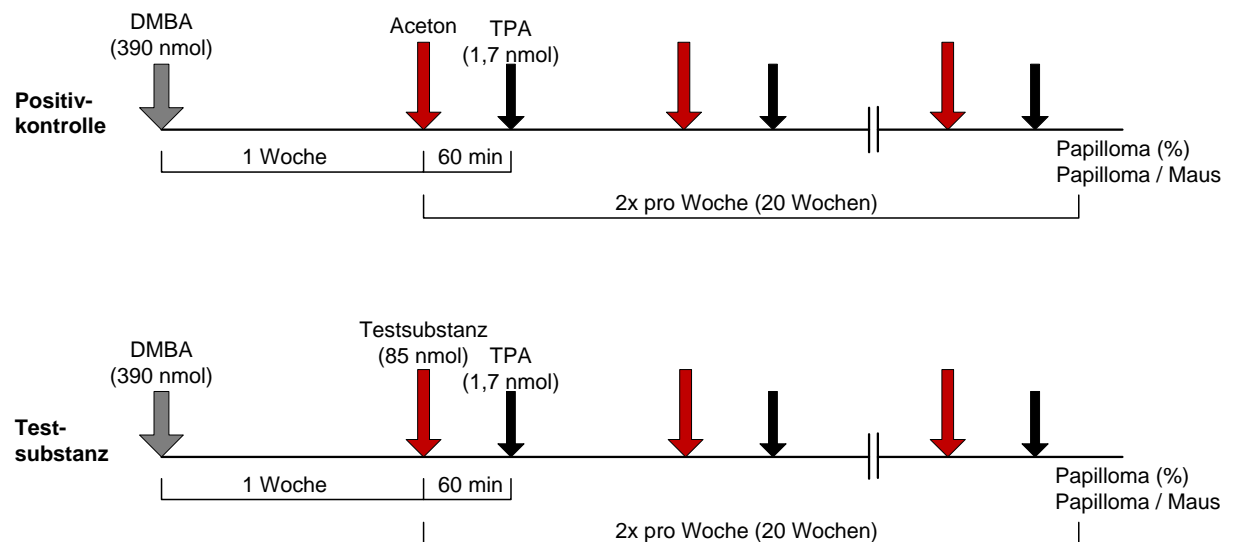
### 2.15.2 *In vitro* -Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität

Der *in vitro*-Test wurde durch Dr. H. Tokuda von der Kanazawa Universität durchgeführt. Die Inhibierung des frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV), was auch Humanes Herpes-Virus 4 genannt wird und ein humanpathogenes, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae ist, kann über indirekte Immunfluoreszenzmessung bestimmt werden. Dafür werden  $1 \times 10^6$  Raji-Zellen, EBV-Genom tragende menschliche lymphoblastische Zellen, für 48 h bei 37 °C in 10 %igem RPMI 1640 Medium kultiviert. Dabei enthält 1 ml des Mediums 4 mM n-Buttersäure und 32 nM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), welches als Tumorpromotor dient. Alle anderen Ansätze enthalten 5 µl in DMSO gelöste Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen. Durch die Fluoreszenz wird die Wirksamkeit ermittelt und die Zellvitalität wird mikroskopisch über den Farbstoff „Trypan Blue“ bestimmt (Colombo et al. 2000, Colombo et al. 2002, Colombo et al. 2004, Ito et al. 2005, Nakata et al. 2007). Für jeden Assay-Ansatz werden 500 Zellen gezählt und dieses Experiment zweimal

durchgeführt. Dabei sollte die Zytotoxizität und die Zellvitalität nach zwei Tagen mehr als 60 % betragen (Shirahashi et al. 1993, Colombo et al. 2002).

### 2.15.3 *In vivo* - „two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test

Dieser *in vivo*-Test wurde ebenfalls durch Dr. H. Tokuda von der Kanazawa Universität in Japan durchgeführt. Der schematische Ablauf ist in Abb. 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.2: Workflow eines „two-stage mouse skin carcinogenesis“ Test**

Dazu wurden je 10 fünf Wochen alte, weibliche Mäuse des Stamms ICR (Institute of Cancer Research, Washington, D.C., USA) zunächst auf dem Rücken rasiert. Diese Stellen wurden mit 100 µg DMBA (7,12-Dimethylbenz[α]anthracen), gelöst in 0,1 ml Aceton, behandelt. Beginnend eine Woche nach dieser Behandlung wurde zweimal wöchentlich mit TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat), in der Konzentration 1 µg pro 1 ml Aceton, als Promotor aufgetragen. Jeweils eine Stunde davor wurde die Maus, die als Positivkontrolle diente, mit Aceton und die anderen mit der Testsubstanz (85 nmol in Aceton gelöst) behandelt. Diese Versuchsreihe wurde für 20 Wochen fortgesetzt und die Anzahl der Papilloma pro Maus dokumentiert (Mendoza et al. 2005, Colombo et al. 2006). Das durch DMBA- und TPA-Behandlung ausgelöste Karzinom ist dabei ein Plattenepithel-Karzinom der Haut.

### 3 Ergebnisse

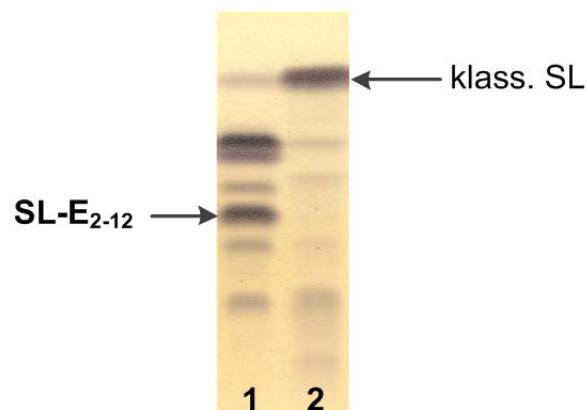
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die enzymatische Modifikation mikrobiell produzierter Alkyl-Sophoroside und Mannosylerythritol-Lipide, um neue Glykokonjugate mit neuen Eigenschaften zu erhalten. Außerdem sollte *C. bombicola* mit ungeradkettigen Co-Substraten kultiviert werden, neue Komponenten isoliert, ihre Struktur ermittelt und reine Komponenten charakterisiert werden. Der Ergebnisteil wurde daher in drei Teile gegliedert, wobei sich die ersten beiden Teile mit den Ergebnissen der Biokatalyse-Experimente an Alkyl-Sophorosiden und Mannosylerythritol-Lipiden beschäftigen. Der dritte Teil befasst sich mit den Produkten aus der Kultivierung mit ungeradkettigen Co-Substraten. In den ersten beiden Abschnitten ging es zunächst um die mikrobielle Produktion dieser Substanzen, deren Isolierung und Aufarbeitung durch verschiedene Extraktionsschritte und um die Trennung dieser in ihre Einzelkomponenten via Mitteldruckchromatographie (MPLC). Anschließend Vorversuche zur Modifikation der Glycolipide führten schrittweise zum Endergebnis und zu neuen Modifikationsansätzen. Diese neu erhaltenen Glykokonjugate wurden über die Strukturaufklärung mittels NMR/MS genauer untersucht. Weiterhin erfolgte eine umfassende Charakterisierung dieser neuen Substanzen durch physicochemische Tests, z.B. die Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser, und über biologische Aktivitätstests, wie beispielsweise die Bestimmung der Anti-Tumor-Promoting-Aktivität.

#### 3.1 Projektteil: 2-Dodecyl-Sophoroside

Erstmalig wurden die Alkyl-Sophoroside bei Brakemeier (Brakemeier et al. 1995) beschrieben und deren Struktur mittels NMR/MS-Analyse aufgeklärt (Brakemeier et al. 1998a). Um diese Substanzen für die enzymatische Modifikation zu nutzen, wurden diese zunächst mit Hilfe der Hefe *C. bombicola* produziert. Nach deren Aufarbeitung (Abschnitt 3.1.1) konnte SL-E<sub>2-12</sub> als Ausgangssubstrat für verschiedene Modifikationen, z.B. die Glycosidase-Katalyse (Abschnitt 3.1.2.1), genutzt werden.

### 3.1.1 Kultivierung, Isolierung und Aufarbeitung der Ausgangssubstanzen für die nachfolgenden Modifikationen

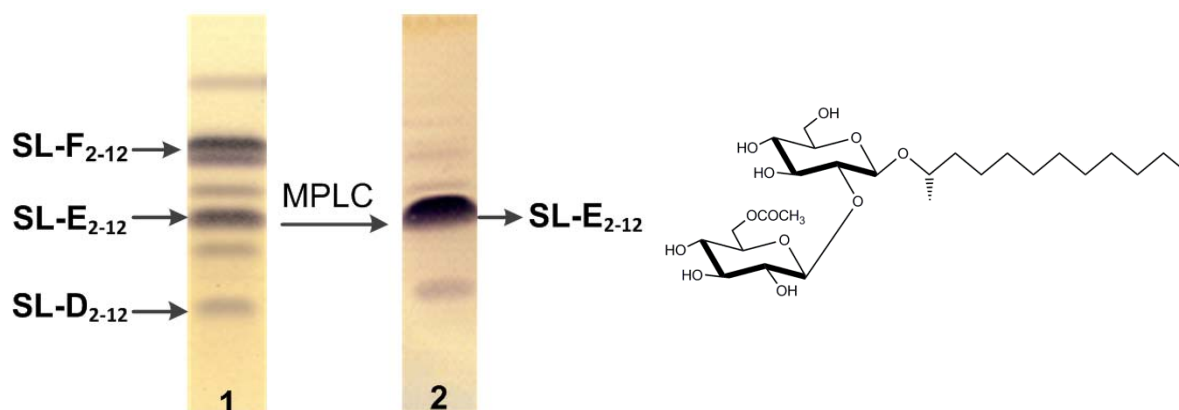
Bereits in den 80iger und 90iger Jahren wurden Sophoroselipide auf verschiedenen Substraten kultiviert, z.B. mit Glucose als C-Substrat in Verbindung mit Ölsäure oder Sonnenblumenöl als Co-Substrat (Asmer et al. 1988, Klekner et al. 1991, Rau et al. 1996). Dabei wurden die sogenannten klassischen Sophoroselipide mit dem häufigsten Lipidanteil 17-Hydroxy-octadecensäure erhalten. Unter der Verwendung von 2-Dodecanol als Co-Substrat, wie bei Brakemeier beschrieben, wurden neuartige Alkyl-Sophoroside gebildet (Brakemeier et al. 1995) (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** NP-DC der SL-Rohprodukte aus verschiedenen Kultivierungen. 1) mit 2-Dodecanol als Co-Substrat, 2) mit Sonnenblumenöl als Co-Substrat. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

Nach neuntägiger Kultivierung folgten verschiedene Extraktionsschritte (Abschnitt 2.8.4), um überschüssige Fette aus dem SL-Rohprodukt zu entfernen und somit eine Aufreinigung zu erzielen. Danach konnte der Sophoroselipid-Anteil bestimmt werden, welcher bei ca. 1 g/l lag.

Die weitere Aufreinigung bzw. Trennung in die Einzelkomponenten ausgehend vom SL-Rohprodukt wurde durch die MPLC erreicht, wobei pro Lauf 1 g Rohprodukt eingesetzt werden konnte. Dabei wurde SL-E<sub>2-12</sub> als gewünschte Hauptkomponente definiert, die für die folgenden Modifikationen eingesetzt werden sollte. Diese war in ausreichender Menge im Rohprodukt enthalten und konnte gut von den anderen Komponenten getrennt werden (Abb. 3.2). Durchschnittlich wurde 0,2 g SL-E<sub>2-12</sub> aus der Trennung von 1 g Rohprodukt mittels MPLC erhalten und stand für die Modifikationsversuche zur Verfügung.



**Abb. 3.2:** NP-DC des 1) SL-Rohprodukts aus Kultivierung mit 2-Dodecanol als Co-Substrat mit den wichtigsten Komponenten SL-D<sub>2-12</sub>, SL-E<sub>2-12</sub> und SL-F<sub>2-12</sub>, 2) SL-E<sub>2-12</sub> nach der Trennung mittels MPLC und nebenbestehender bekannter Struktur. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

### 3.1.2 Enzymatische Modifikation an 2-Dodecyl-Sophorosiden und 2-Dodecyl-Glucosiden

Zunächst wurde angestrebt, eine selektive Abspaltung des 2-Dodecanol-Anteils mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Glycosidasen zu erzielen, um zu dem Disaccharid Sophorose zu gelangen. Dieses Zielprodukt ist zwar käuflich zu erwerben, aber derzeit nur zu einem sehr hohen Preis (271,50 € für 10 mg; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim; Stand: November 2012). Außerdem sollte aus dem 2-Dodecyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> eine Glucose-Einheit mit Hilfe einer  $\beta$ -Glucosidase abgespalten werden. Des Weiteren sollte eine Acylierung primärer Hydroxygruppen mit Hilfe verschiedener Lipasen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Dazu wurden gewöhnliche und ungewöhnliche Fettsäuren verschiedener Kettenlängen, die (*S*)-17-OH-C18 aus dem klassischen Sophoroselipid und die (*R*)-3-OH-C10 aus den Rhamnoselipiden, eingesetzt.

#### 3.1.2.1 Glycosidase-katalysierte Hydrolyse einer glycosidischen Bindung in SL-E<sub>2-12</sub>

Bezüglich des ersten angestrebten Zieles, der selektiven Hydrolyse der glycosidischen Bindung der Sophorose zum 2-Dodecanol, waren die Versuche unter Einsatz verschiedener Glycosidasen in wässrigen Puffersystemen vergeblich. Sophorose konnte im DC-Test nicht detektiert werden.

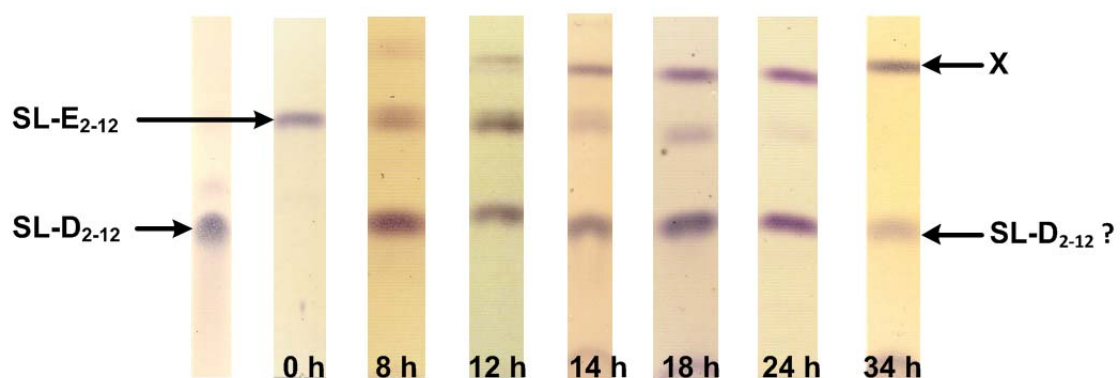
Hinsichtlich des zweiten Zieles, der selektiven Hydrolyse der 1,2-glycosidischen Bindung der beiden Glucose-Einheiten, waren die experimentellen Bemühungen erfolgreicher. Es wurden

zahlreiche Vorversuche zur Bestimmung des optimalen Enzyms, dessen eingesetzter Menge, der Temperatur- und pH-Wert-Optima, sowie der günstigsten Reaktionszeit durchgeführt. Die verwendeten Enzyme waren hierbei die  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Glucuronidase, Hesperidinase und Naringinase (Tabelle 2.2). Diese Ansätze wurden jeweils mit 10 mg Substrat (SL-E<sub>2-12</sub>) und 5 ml Puffer für eine jeweils definierte Zeit und Temperatur im Wasserbad bei 100 rpm geschüttelt. Die experimentell ermittelten vorerst optimalen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1: Eingesetzte Enzyme und die experimentell ermittelten Optima für Enzymmenge, pH-Wert und Temperatur**

Enzyme	Enzymmenge	pH-Wert	Temperatur	Anmerkungen
$\beta$ -Glucosidase	13,8 U	8	37 °C	Sigma-Aldrich GmbH
$\beta$ -Glucuronidase	1044 U	8	37 °C	(Rau et al. 1999, Hammen 2003)
Hesperidinase	6 U	5,7	40 °C	(Rau et al. 1999)
Naringinase	3 U	8	40 °C	(Rau et al. 1999)

Beim Einsatz der  $\beta$ -Glucuronidase ließen sich gemäß des Dünnschichtchromatogramms (Abb. 3.3). schon in der 8 h-Probe zwei Produkte erkennen: ein unpolareres, "X", sowie ein polareres, welches mit "SL-D<sub>2-12</sub> ?" bezeichnet wurde. Hinsichtlich der letzteren Substanz, die nach 34 h ebenfalls zum Produkt "X" umgewandelt worden zu sein scheint, kann vermutet werden, dass es sich um das aus der Literatur bekannte SL-D<sub>2-12</sub> (Brakemeier et al. 1998a) handelt (s. DC-Vergleich).



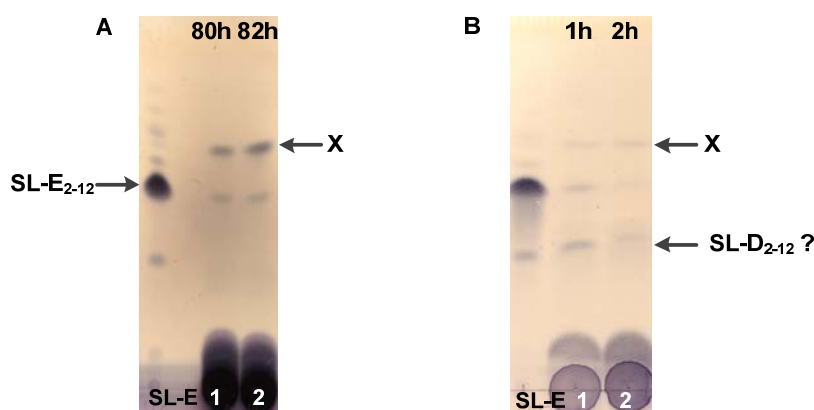
**Abb. 3.3: NP-DC des Tests mit  $\beta$ -Glucuronidase zur SL-E<sub>2-12</sub>-Hydrolyse im zeitlichen Verlauf von 0 h bis 34 h; SL-E<sub>2-12</sub> (10 mg), Enzym (10  $\mu$ l) LSM: 5 ml Phosphatpuffer pH 8 bei 37 °C; 10  $\mu$ l Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure, X und SL-D<sub>2-12</sub>? = neue Produkte**

Diese Verbindung könnte durch eine Acetylesterase gebildet worden sein, die im kommerziellen Glycosidase-Präparat eventuell enthalten war. Ein Experiment mit einer



Acetylesterase (aus Schweineleber) führte zu einem identischen  $R_f$ -Wert in der Dünnschichtchromatographie. In einem separaten Versuch wurde das zur Verfügung stehende SL-D<sub>2-12</sub> mit  $\beta$ -Glucuronidase zur Umsetzung gebracht, wobei - allerdings nach längerer Inkubationszeit - ebenfalls das Produkt "X" gebildet wurde (ohne Abbildung).

Mit den anderen Glycosidasen konnten keine besseren Umsätze erzielt werden. In Gegenwart von  $\beta$ -Glucosidase war in der DC nur ein Spot zu erkennen, der auf der Höhe des "SL-D<sub>2-12</sub> ?" lag. Mit Hesperidinase war, nach allerdings langer Reaktionszeit, ein unpolareres Produkt zu erkennen, welches der Substanz "X" entsprach (Abb. 3.4, A). Die Nachteile dieser Reaktion gegenüber der  $\beta$ -Glucuronidase-Katalyse bestanden im hohem Enzymverbrauch und der zu langen Inkubationszeit. Ein weiteres Problem stellte die Enzymstabilisierung mit Saccharose dar, welche die Reaktion stört. Ein Versuch der Abtrennung der Saccharose führte zum Aktivitätsverlust des Enzyms. Bei Verwendung von Naringinase schließlich wurde beobachtet, dass schon nach kurzer Zeit "X" und "SL-D<sub>2-12</sub> ?" gebildet wurden, aber auch sehr rasch nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 3.4, B).



**Abb. 3.4: NP-DC des Tests mit der Hesperidinase (A) und Naringinase (B) zur SL-E<sub>2-12</sub>-Hydrolyse. A - 1) nach 80 h 2) nach 82 h Reaktionszeit; B - 1) nach 1 h und 2) nach 2 h; LSM: Phosphatpuffer mit definiertem pH-Wert. 10  $\mu$ l Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure**

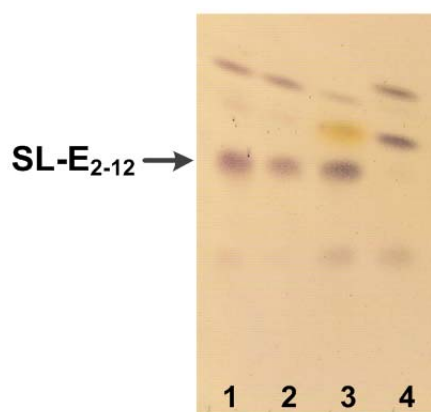
Angeichts dieser Ergebnisse wurde das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase für einen präparativen Ansatz ausgewählt, um größere Mengen der Glycolipide "X" und "SL-D<sub>2-12</sub> ?" für anschließende NMR/MS-Analysen zu gewinnen.

Ausdrücklich angemerkt sei hier, dass die bzgl. der  $\beta$ -Glucuronidase-Reaktion gezeigte Darstellung des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (Abb. 3.3) aufgrund des Aufwands eine Ausnahme darstellt. Bei allen

weiteren enzymatischen Umsetzungen werden zumeist nur die DC-Ergebnisse der präparativen Ansätze präsentiert.

### **3.1.2.2 Lipase-katalysierte Acylierungen mit gewöhnlichen Fettsäuren an SL-E<sub>2-12</sub>**

Zunächst galt es herauszufinden, welches das beste organische Lösungsmittel für die Reaktion mit verschiedenen Lipasen ist. Neben MTBE, dass auch von Langer für eine Modifikationsreaktion bei einer Temperatur von 55 °C genutzt wurde (Langer 2004), wurden n-Hexan, n-Heptan und tert. Amylalkohol unter der Verwendung verschiedener Lipasen und der Fettsäure Decansäure für den Reaktionsansatz genutzt. Dabei wurde die Reaktionstemperatur von Langer übernommen. Aus den verschiedenen Ansätzen konnte MTBE als bestes Lösungsmittel ermittelt werden, da erste enzymatische Modifikationen zu beobachten waren. Anschließend sollte die ideale Lipase (siehe Tabelle 2.2) für eine Acylierung gefunden werden. Dafür wurden 8 verschiedene Lipasen unter der Verwendung von Decansäure getestet. In Abb. 3.5 sind die Ansätze zu sehen, die zu neuen Banden im Dünnschichtchromatogramm geführt haben. Unter dem Einsatz der Lipase Novo 388 (Spur 3) wurde beobachtet, dass die gebildeten neuen Produkte mit zunehmender Zeit wieder abnehmen, d.h. nicht stabil sind. Mit den Enzymen IM 20 und IM 60 war jeweils eine identische starke Bande und eine schwächere Bande zu sehen und mit Novozym 435 sogar zwei starke Banden, die unterschiedlich zu den Banden von IM 20/IM 60 sind. Außerdem war in diesem Ansatz der Umsatz des Substrates SL-E<sub>2-12</sub> sehr gut, da die entsprechende Bande dafür im Dünnschichtchromatogramm nicht mehr zu erkennen war. Daher wurden mit den Enzymen IM 20 und Novozym 435 weiterführende Experimente angestrebt, d.h. jeweils ein präparativer Ansatz durchgeführt, um genügend Substanz für die Strukturaufklärung zu erhalten.



**Abb. 3.5:** NP-DC des Vortests mit verschiedenen Enzymen (10 mg) zur SL-E<sub>2-12</sub>-Acylierung. SL-E<sub>2-12</sub> (5 mg), LSM: MTBE (1,5 ml), Reaktionszeit 30 h; 1) IM 20, 2) IM 60, 3) Novo 388 und 4) Novozym 435. Reaktionstemperatur 55 °C, LSM: MTBE. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

Der gleiche Testansatz mit den vier verschiedenen Enzymen wurde mit der Fettsäure Stearinsäure durchgeführt und ein ähnliches Verhalten, wie beim Decansäure-Ansatz, beobachtet. Daher gestaltete sich der allgemeine präparative Ansatz, der bei 55 °C und 100 rpm im Wasserbad geschüttelt wurde, wie in Tabelle 3.2 aufgelistet.

**Tabelle 3.2:** Präparativer Ansatz bei 55 °C und 100 rpm im Wasserbad

Reaktionskomponenten	Eingesetzte Mengen
SL-E <sub>2-12</sub>	60 mg
Fettsäuren: Decan- oder Stearinsäure	120 mg
Enzyme: Novozym 435 oder IM 20	120 mg
Lösungsmittel: MTBE	35 ml
Trocknungsmittel: aktiviertes Molsieb	2 g

In Abb. 3.6 sind die DC-analytischen Ergebnisse der präparativen Ansätze unter Verwendung der Fettsäuren Decansäure oder Stearinsäure und der Enzyme Novozym 435 oder IM 20 abgebildet. Bei allen Ansätzen waren zwei starke Banden, und somit zwei neu entstandene Glycokonjugate, zu erkennen, die mittels MPLC getrennt und anschließend für die Strukturaufklärung (Abschnitt 3.1.3) vorbereitet wurden.



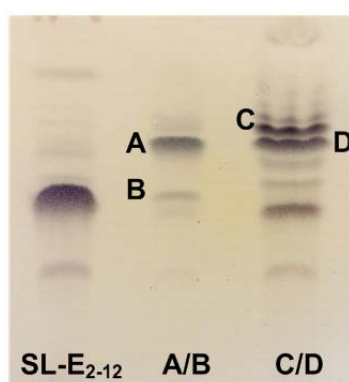
**Abb. 3.6:** NP-DC der präparativen Ansätze 1-4 der Lipase-katalysierten Acylierung von SL-E<sub>2-12</sub>. 1) Decansäure mit Novozym 435, 2) Decansäure mit IM 20, 3) Stearinsäure mit Novozym 435, 4) Stearinsäure mit IM 20. Reaktionstemperatur 55 °C, LSM: MTBE. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure; A-H zu separierende Banden (in Zusammenarbeit mit (Park 2010))

### 3.1.2.3 Lipase-katalysierte Acylierungen mit ungewöhnlichen Fettsäuren an SL-E<sub>2-12</sub>

Nachdem die Reaktionsansätze mit Decan- bzw. Stearinsäure offensichtlich zu neuartigen Glycolipiden geführt haben, wurde das entwickelte System auf die Reaktion mit den ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-C10 und 17-OH-C18 übertragen und im kleinen Ansatz zunächst die Lipasen IM 20, IM 60, Novo 388 und Novozym 435 getestet. Die Reaktionen waren ähnlich erfolgreich, wie die vorangegangenen Ansätze, so dass die Lipasen IM 20 und Novozym 435 für weitere Versuche herangezogen wurden. Ein weiterer Aspekt war das Auffinden von noch besser geeigneten organischen Lösungsmitteln für diese Reaktionen, da der Siedepunkt von MTBE dem Reaktionsoptimum entspricht und daher stark flüchtig ist. Daher wurde nach Lösungsmitteln mit einem höheren Siedepunkt gesucht und dafür Toluol, Benzol, Octanol, Hexan, Octan und Propylacetat genutzt. Zunächst wurde die Löslichkeit von SL-E<sub>2-12</sub> in diesen Lösungsmitteln getestet. Dabei wurde festgestellt, dass SL-E<sub>2-12</sub> in Toluol, Benzol und Octanol löslich ist und somit diese Lösungsmittel für einen Reaktionsansatz (1,5 ml LSM, 5 mg SL-E<sub>2-12</sub>, 10 mg Fettsäure, 5 mg Lipase und Molsieb) in Frage kamen. In Octanol konnte nur das bekannte SL-D<sub>2-12</sub> gewonnen werden; d.h. es entstanden keine neuen Banden und somit keinen neuen Glycokonjugate. Daher ist dieses Lösungsmittel für diesen Versuch nicht geeignet. Nur die Verwendung von Toluol führte zu eindeutigen und stabilen neuen Banden, d.h. neuen Glycokonjugaten. Weitere Versuchsansätze wurden daher in Toluol, dessen Siedepunkt bei 111 °C liegt und damit höher ist als die eingesetzten Reaktionstemperaturen, und mit den Lipasen Novozym 435 und IM 20 durchgeführt. Mit

diesen Vorgaben wurde getestet, ob sich eine Veränderung der Temperatur auf die Produkte auswirkt. Es erfolgte ein Test bei Temperaturen von 55 °C, 65 °C und 75 °C, wobei sich letztere als Methode der Wahl herausstellte.

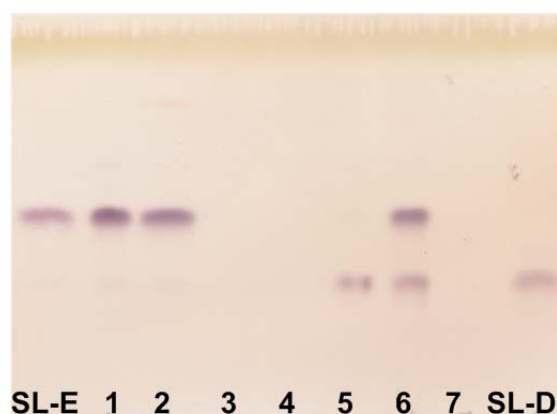
Aus diesen Erkenntnissen und Vortests mit den gewöhnlichen Fettsäuren, wurde der Standardansatz (Abschnitt 2.12.1.2) für die Lipase-katalysierte Acylierung für ungewöhnliche Fettsäuren formuliert. Die präparativen Ansätze mit 3-OH-C10 bzw. 17-OH-C18 ergaben im Dünnschichtchromatogramm jeweils zwei dominante neue Glycokonjugate, die anschließend via MPLC in die Einzelkomponenten A bis D getrennt (Abb. 3.7) und mittels NMR/MS strukturell aufgeklärt wurden (Abschnitt 3.1.3).



**Abb. 3.7:** NP-DC der präparativen Ansätze der Lipase-katalysierten Acylierung von SL-E<sub>2-12</sub>. A/B) 3-OH-C10 mit Novozym 435 nach 72 h, C/D) 17-OH-C18 mit IM 20 nach 48 h. Reaktionstemperatur 75 °C, LSM: Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure; A-D zu separierende Banden

Für die Stabilitätseinschätzung der genutzten Substanzen unter Einfluss des organischen Lösungsmittels Toluol und der beiden Lipasen Novozym 435 und IM 20 wurde eine Testreihe mit unterschiedlicher Kombination von Lösungsmittel zu Lipase durchgeführt (Abb. 3.8). Dabei ist zu sehen, dass sowohl unter Einsatz von Toluol bei 75 °C und 100 rpm als auch unter Verwendung des Gemisches Chloroform:Methanol (7:3) bei Raumtemperatur, welches als Lösungsmittel für die NMR-Analyse diente, kaum SL-D<sub>2-12</sub> (Bestätigung durch <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR-Analyse; s. Anhang Tabelle VI. 2) entsteht. Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von SL-E<sub>2-12</sub>, Toluol und der Lipasen zu einer Hydrolyse der Acetatgruppe in R<sub>2</sub>-Position. Dabei besitzt das entstandene Beiprodukt den gleichen R<sub>f</sub>-Wert, wie das zum Vergleich aufgetragene SL-D<sub>2-12</sub>. Dies ist auf die enzymatische Wirkung der Lipasen in Gegenwart von Spuren an Wasser zurückzuführen. Dabei war zu erkennen, dass die Lipase Novozym 435 das Substrat SL-E<sub>2-12</sub> nach 48 h Reaktionszeit zu SL-D<sub>2-12</sub> umgesetzt hat (Spur 5). Die Lipase

IM 20 zeigte einen ähnlichen Ansatz, aber es wurde nicht das komplette SL-E<sub>2-12</sub> nach 48 h zu SL-D<sub>2-12</sub> umgewandelt (Spur 6). D.h., dass das Beiprodukt SL-D<sub>2-12</sub> auf den Einsatz der Lipase in Kombination mit dem Substrat SL-E<sub>2-12</sub> zurückzuführen ist und nicht auf die eigentliche, z.B. Lipasen-katalysierte Acylierung von Fettsäuren (Abb. 3.7). SL-E<sub>2-12</sub> war unter diesen Bedingungen nicht stabil und es erfolgt ein schrittweiser Umsatz zu SL-D<sub>2-12</sub>, was aber die Hauptreaktion, z.B. Acylierung, nicht stört, aber die Ausbeute des gewünschten Produktes etwas beeinflusst.



**Abb. 3.8:** NP-DC des Stabilitätstests der Komponenten des Reaktionsansatzes in verschiedener Kombination nach einer Reaktionszeit von 48 h bei Reaktionstemperatur 75 °C (2-7) oder Raumtemperatur (1), eingesetztes SL-E<sub>2-12</sub> und Lipasen jeweils 2 mg, LSM (Toluol oder Chloroform:MeOH) jeweils 2 ml  
**1)** SL-E<sub>2-12</sub> + Chloroform:MeOH (7:3), **2)** SL-E<sub>2-12</sub> + Toluol, **3)** Novozym 435 + Toluol, **4)** IM 20 + Toluol **5)** SL-E<sub>2-12</sub> + Toluol + Novozym 435, **6)** SL-E<sub>2-12</sub> + Toluol + IM 20, **7)** Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

Im Ansatz in Spur 5 mit der Lipase Novozym 435 wurde SL-E<sub>2-12</sub> komplett zu SL-D<sub>2-12</sub> umgewandelt, wobei das im Ansatz in Spur 6 nur zum Teil der Fall war. Erwartungsgemäß war nur beim Einsatz der Lipasen in Toluol keine Bande im Dünnschichtchromatogramm zu sehen.

#### 3.1.2.4 Lipase-katalysierte Acylierung von GL-A<sub>2-12</sub> mit Sebacinsäure

Zunächst wurden auch für diesen Versuchsteil, der Modifikation des aus der  $\beta$ -Glucuronidase-Reaktion hervorgegangen Alkyl-Glucosids, zunächst Vorversuche im kleinen Maßstab durchgeführt. Dafür wurde ebenfalls das Lösungsmittel Toluol genutzt sowie das Enzym Novozym 435. Die Temperatur wurde entsprechend voriger Experimente mit 60 °C, 65 °C und 70 °C gewählt und dabei 65 °C als günstigste Temperatur gefunden. Die Entstehung neuer Produkte aus GL-A<sub>2-12</sub> konnte bereits nach 3 h Reaktionszeit beobachtet und nach 48 h konnte beim Einsatz von Sebacinsäure ein Hauptprodukt aufgefunden

werden. Um dieses in ausreichender Menge für die Strukturaufklärung zu erhalten, wurde ein präparativer Ansatz nach dem Schema in Tabelle 2.17 durchgeführt, anschließend mittels MPLC aufgereinigt und durch NMR- und MS-Analyse strukturell aufgeklärt.



**Abb. 3.9: NP-DC der präparative Ansätze nach 48 h der Lipase-katalysierten Acylierung von GL-A<sub>2-12</sub>. A) mit Sebacinsäure.** Reaktionstemperatur 65 °C; LSM: Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

### 3.1.3 Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und  $(^1\text{H}, ^1\text{H})$ - und  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -COSY-Spektren sowie die Massenspektren (Positiv-Ionen ESI-MS) wurden für die Strukturaufklärung herangezogen. Alle aus der enzymatischen Modifikation resultierenden neuartigen Glykokonjugate und ihre Ausgangssubstanzen wurden auf diese Weise analysiert.

#### 3.1.3.1 Strukturen der neuen Glykokonjugate aus der Glycosidase-katalysierten Hydrolyse von SL-E<sub>2-12</sub>

Wie in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben, wurde bei der enzymatischen Modifikation der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> mit dem Enzym  $\beta$ -Glucuronidase eine neue Verbindung "X" (Abb. 3.3) beobachtet und zur Strukturaufklärung via MPLC aufgereinigt und isoliert.

Bei dieser neuen Substanz handelt es sich um ein Glucoselipid, d.h. bei der Reaktion mit  $\beta$ -Glucuronidase wurde aus der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub>, genauer gesagt aus dem Disaccharid Sophorose, eine Acetylglucose-Einheit abgespalten (Abb. 3.10).

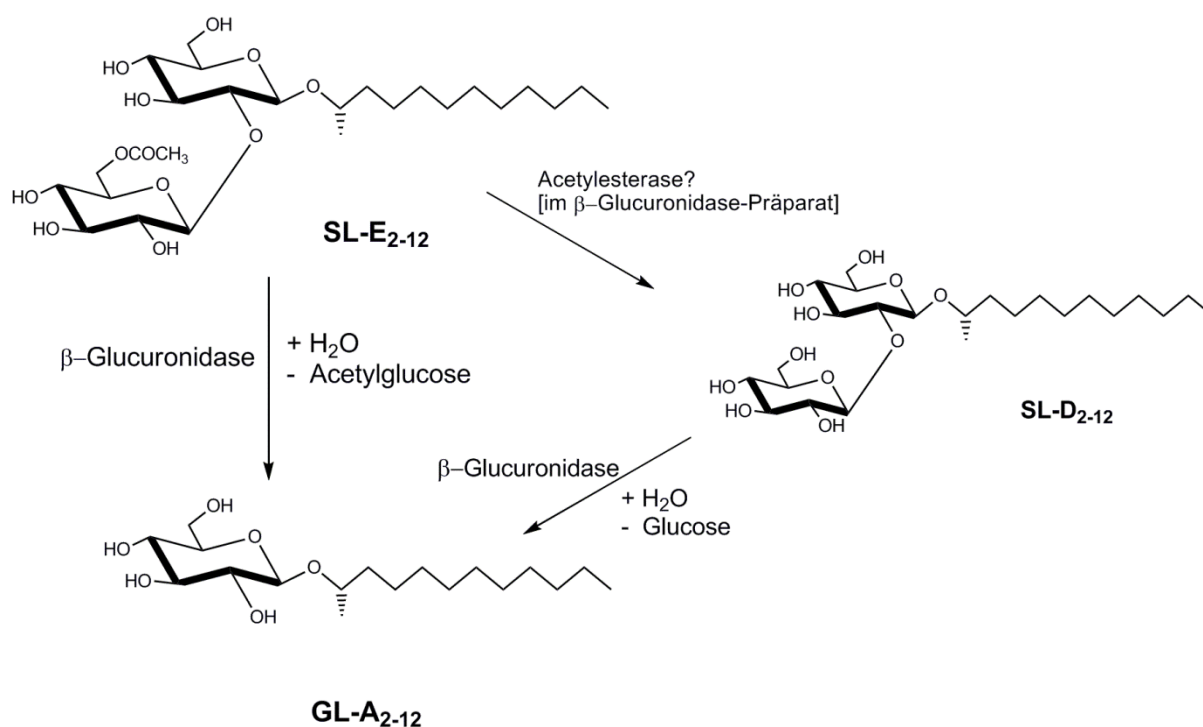


Abb. 3.10: Enzymatische Modifikation von a) SL-E<sub>2-12</sub> mittels  $\beta$ -Glucuronidase zur Bildung des neuen Glykokonjugats GL-A<sub>2-12</sub> b) Nebenreaktion über SL-D<sub>2-12</sub> zu GL-A<sub>2-12</sub> durch mögliche Acetylglucuronidase-Aktivität im  $\beta$ -Glucuronidase-Präparat



Ein DC-Vergleich mit dem mikrobiell hergestellten GL-A<sub>2-12</sub> der Dissertation von Brakemeier (Brakemeier 1997) ergab eine Übereinstimmung der R<sub>f</sub>-Werte. Die Daten aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Analysen bestätigen diese Vermutung (Tabelle 3.8).

Bzgl. der Substanz "SL-D<sub>2-12</sub> ?" konnte mittels <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR-Analyse (s. Anhang Tabelle VI. 2) die zuvor geäußerte Vermutung, Bildung von SL-D<sub>2-12</sub>, bestätigt werden. Dabei wurde die Acetylgruppe an 6''-Position abhydrolysiert worden war, wahrscheinlich verursacht durch nicht abgetrennte Acetylesterase im β-Glucuronidase-Präparat (Abb. 3.10).

### **3.1.3.2 Strukturen der neuen Glykokonjugate aus den Lipase-katalysierten Acylierungen von SL-E<sub>2-12</sub> und GL-A<sub>2-12</sub>**

Die beobachteten neuartigen Glycolipide aus der Acylierung mit Decan- und Stearinsäure und auch die Glykokonjugate aus der Acylierung mit 3-Hydroxy-Decansäure und 17-Hydroxy-Stearinsäure wurden isoliert und mittels NMR/MS strukturell aufgeklärt.

#### ***Resultate der Acylierung von SL-E<sub>2-12</sub> mit Decan- und Stearinsäure***

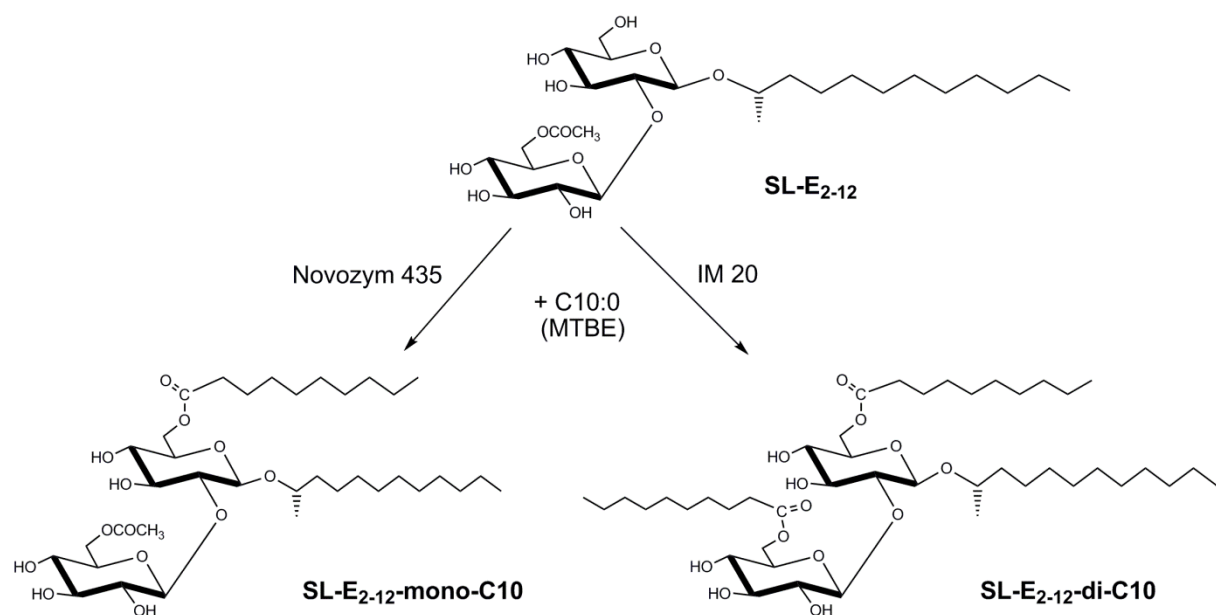
Es konnten acht neuartige Glykokonjugate isoliert (Abb. 3.6), mittels NMR/MS-Analyse bearbeitet und die Daten interpretiert werden. In Tabelle 3.3 werden die Resultate zusammengefasst und den aufgeklärten Reinsubstanzen eine neue Bezeichnung gegeben. Die Verbindungen, die durch die Strukturaufklärung als Gemisch aus Monoacylierungen an Position 6' und 6'' hervorgingen, wurden für die weiteren Analysen nicht mitgeführt, da es sich nicht um Reinsubstanzen handelte. D.h. es wurden drei neue Verbindungen als Reinsubstanzen beschrieben, die für die weiterführende Charakterisierung eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich um eine Mono- und eine Diacylierung mit der Decansäure bzw. um eine Monoacylierung mit der Stearinsäure.

**Tabelle 3.3: Ergebnisse der Strukturaufklärung und deren neue Bezeichnung**

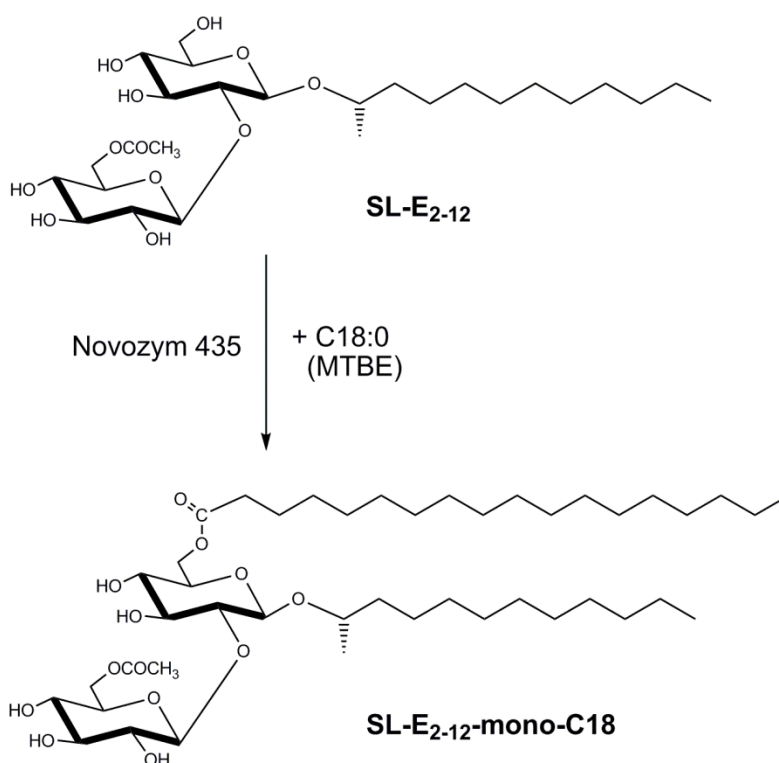
Neue Glycokonjugate	Strukturelle Besonderheit	Bezeichnung
A	Diacylierung an 6' und 6'' von C10	SL-E <sub>2-12</sub> -di-C10 <sup>+</sup>
B	*	
C	Monoacylierung an 6' von C10	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C10 <sup>+</sup>
D	*	
E	*	
F	*	
G	Monoacylierung an 6' von C18	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C18 <sup>++</sup>
H	*	

\*Gemisch aus den Monoacylierungen an Position 6' und 6'', <sup>+</sup> Decansäure, <sup>++</sup> Stearinsäure

In Abb. 3.11 und Abb. 3.12 sind entsprechend der Tabelle 3.3 die mit Blick auf die Strukturaufklärung erfolgreich verlaufenen Reaktionsschemata zur enzymatischen Acylierung von SL-E<sub>2-12</sub> dargestellt.



**Abb. 3.11: Enzymatische Modifikation von SL-E<sub>2-12</sub> mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit Decansäure. Zwei neue Produkte: SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-di-C10**



**Abb. 3.12: Enzymatische Modifikation von SL-E<sub>2-12</sub> mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit Stearinsäure. Neues Produkt: SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C18**

Gegenüber den <sup>1</sup>H-NMR-Daten der Ausgangsverbindung SL-E<sub>2-12</sub> sind bezüglich der neuen Moleküle folgende signifikanten Merkmale zu entnehmen (Tabelle 3.4):

In SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C10 ist die Acetylgruppe in C-6''-Position erhalten geblieben (Singulett bei 2.1 ppm). Die neue Decanoyl-Gruppe befindet sich in Position C-6' der Sophorose, was aus der charakteristischen Tieffeld-Verschiebung für H-6A und H-6B (4.45/4.23 ppm), verglichen mit SL-E<sub>2-12</sub> (3.88/3.70 ppm), abzulesen ist (Ramm et al. 2004).

Bei SL-E<sub>2-12</sub>-di-C10 fehlt das Signal für die Acetylgruppe (2.1 ppm). Diese ist durch eine längere Acylgruppe (C-10) ersetzt, nachgewiesen durch ein verstärktes Integral bei 1.30-1.39 ppm für die Methylenprotonen sowie durch Konstanz der ppm-Werte für die für H-6A- und H-6B-Werte an der Position C-6'.

Im Spektrum von SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C18 ist die Acetylgruppe an C-6'' erhalten (Singulett bei 2.08 ppm). Im Vergleich zu den Decanoylgruppen (SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C10) machen sich hier die Methylenprotonen der Dodecanoylgruppen in Bereich zwischen 1.30 und 1.40 ppm noch stärker bemerkbar.

**Tabelle 3.4:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von SL-E<sub>2-12</sub>, SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-di-C10 (alle aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD) sowie von SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C18 (aufgenommen in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 7:3); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		SL-E <sub>2-12</sub>	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C10	SL-E <sub>2-12</sub> -di-C10	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C18
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7	4.49 d / 7.7	4.48 d / 7.7	4.51 d / 7.7
	C-2'	3.30 dd / 7.9/9.2	3.29 dd / 7.8/9.3	3.29 dd / 7.8/9.3	3.29 dd / 7.7/9.2
	C-3'	3.58 t / 9.1	3.59 t / 9.1	3.59 t / 9.1	3.43 t / 9.1
	C-4'	3.33 – 3.38 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m
	C-5'	3.33 – 3.38 m	3.33 – 3.36 m	3.46 – 3.50 m	3.33 – 3.36 m
	C-6'A	3.88 dd / 2.3/12.0	4.45 dd / 2.0/11.8 <sup>a</sup>	4.45 dd / 2.0/11.8 <sup>a</sup>	4.20 – 4.27 m
	C-6'B	3.70 dd / 5.6/11.9	4.23 dd / 5.3/11.9	4.21 dd / 6.5/11.8 <sup>a</sup>	4.20 – 4.27 m
	C-1''	4.59 d / 7.8	4.60 d / 7.8	4.58 d / 7.8	4.45 d / 7.8
	C-2''	3.33 – 3.38 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m
	C-3''	3.41 t / 9.1	3.42 t / 9.0	3.38 – 3.43 m	3.56 t / 9.0
	C-4''	3.33 – 3.38 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m	3.33 – 3.36 m
	C-5''	3.48 – 3.51 m	3.47 – 3.49 m	3.46 – 3.50 m	3.44 – 3.46 m
	C-6''A	4.41 dd / 2.1/11.9	4.41 dd / 2.2/11.9 <sup>a</sup>	4.43 dd / 2.1/11.9 <sup>a</sup>	4.32 – 4.39 m
	C-6''B	4.23 dd / 5.3/11.9	4.21 dd / 6.6/11.7	4.23 dd / 5.5/11.9 <sup>a</sup>	4.32 – 4.39 m
	CH <sub>3</sub> COO- (C-6'')	2.10 s	2.10 s	-	2.08 s
Alkohol	C-1	1.26 d / 6.2	1.24 d / 6.2	1.23 d / 6.2	1.29 d / 6.2
	C-2	3.83 – 3.85 m	3.76 – 3.79 m	3.76 – 3.79 m	3.77 – 3.79 m
	C-3 A	1.40 – 1.47 m	1.42 – 1.46 m	1.42 – 1.48 m	1.40 – 1.43 m
	C-3 B	1.63 – 1.67 m	1.61 – 1.65 m	1.61 – 1.67 m	1.59 – 1.64 m
	C-4 – C-11	1.34 m	1.34 – 1.39 m	1.30 – 1.39 m	1.33 – 1.40 m
	C-12	0.94 t / 7.0	0.94 t / 7.0	0.94 t / 7.0	0.87 t / 7.0
Acylrest	C-1	-	-	-	-
	C-2	-	2.31 t / 7.4	2.32 m	2.28 t / 7.6
	C-3	-	1.61 – 1.65 m	1.61 – 1.67 m	1.59 – 1.64 m
	C-4 – C-9 (bzw. C-4-C-17)	-	1.34 – 1.39 m	1.30 – 1.39 m	1.33 – 1.40 m
	C-10 (bzw. C-18)	-	0.94 t / 7.0	0.94 t / 7.0	0.87 t / 7.0

<sup>a</sup> austauschbar innerhalb der Spalten

### **Resultate der Acylierung von SL-E<sub>2-12</sub> mit 3-OH-Decan- und 17-OH-Stearinsäure**

Aus den beiden präparativen Ansätzen (Abb. 3.7) wurden jeweils zwei Substanzen isoliert und mittels NMR/MS-Spektrometrie analysiert. Dabei wurden aus den Acylierungsreaktionen unter Einsatz der 3-OH-Decansäure keine Monoacylierungen aufgefunden, sondern nur schlecht trennbare Gemische aus Monoacylierungen an Position 6' und 6'' (Tabelle 3.5). Diese wurden nicht für die weiteren Analysen verwendet, da es sich nicht um Reinsubstanzen handelte und eine Strukturaufklärung nicht möglich war.

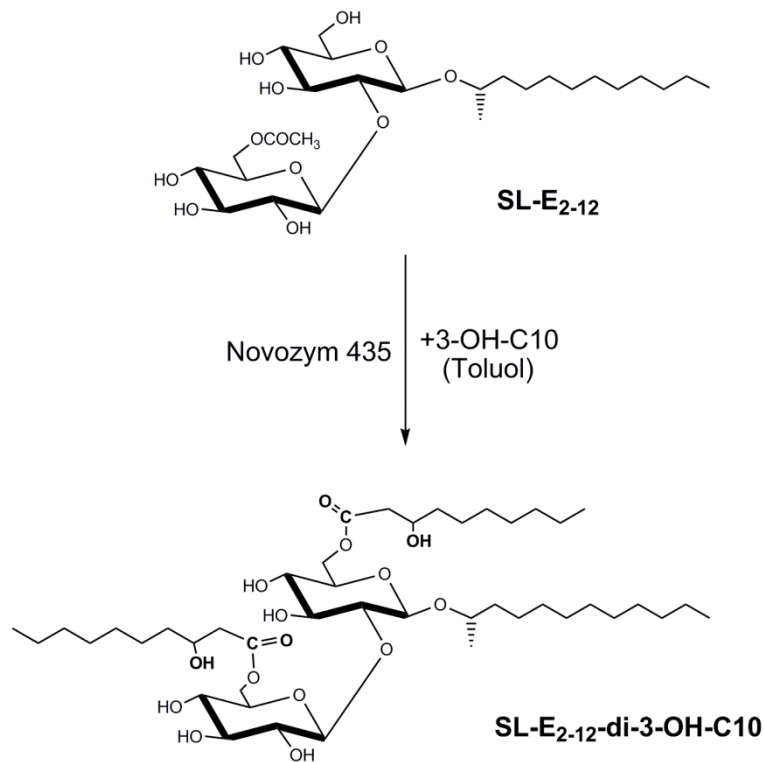
Unter Verwendung der 17-OH-Stearinsäure konnte eines der Gemische (Bande C, Abb. 3.7) trotz einiger Interpretationsschwierigkeiten zwei definierten Verbindungen zugeschrieben werden.

**Tabelle 3.5: Ergebnisse der Strukturaufklärung und deren neue Bezeichnung**

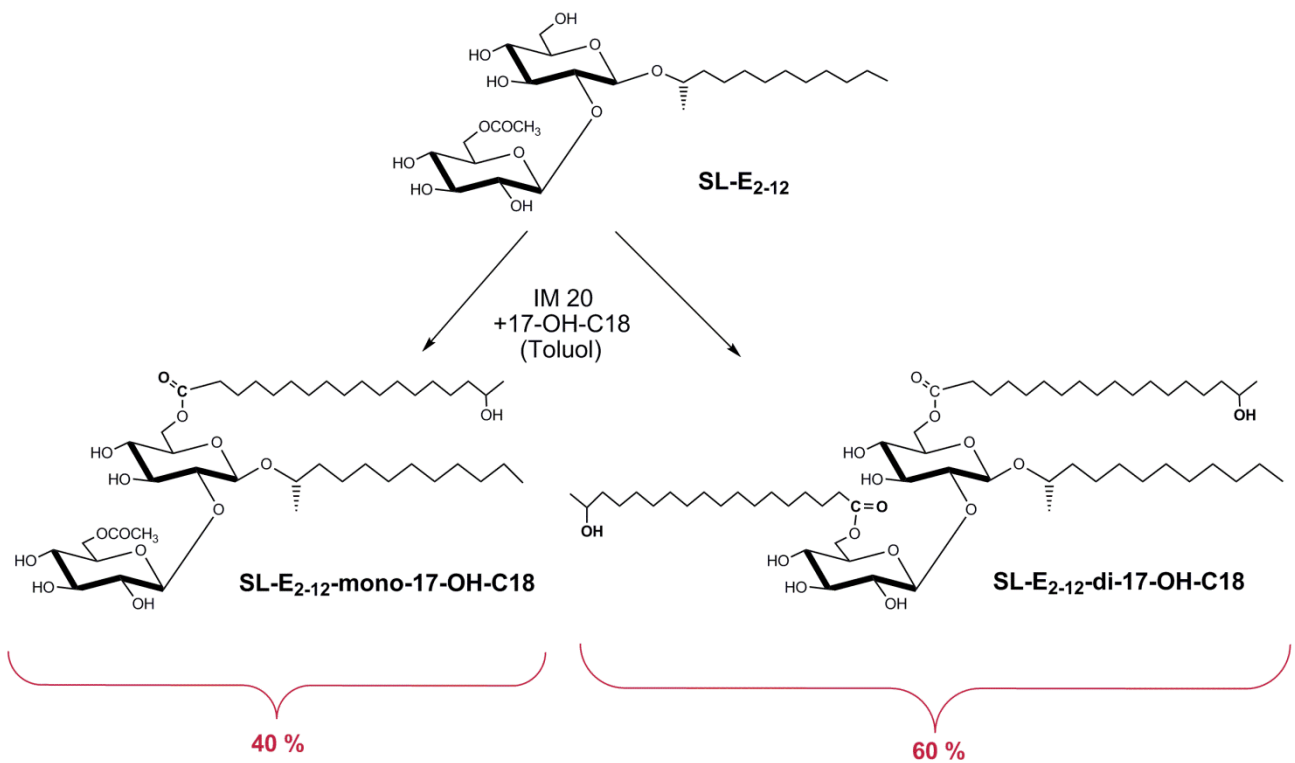
Neue Glycokonjugate	Strukturelle Besonderheit	Bezeichnung
A	Diacylierung an 6' und 6'' von 3-OH-Decansäure	SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10 <sup>#</sup>
B	*	
C	Gemisch aus Monoacylierung (40 %) an 6' und Diacylierung (60 %) an 6' und 6'' von 17-OH-Stearinsäure	SLE <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18 <sup>##</sup>
D	*	

\* Gemisch aus den Monoacylierungen an Position 6' und 6'', <sup>#</sup> 3-OH-Decansäure, <sup>##</sup> 17-OH-Stearinsäure

Die enzymatischen Modifikationen mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit der ungewöhnlichen 3-OH-Decansäure bzw. der ungewöhnlichen 17-OH-Octadecansäure wurden in den Abbildungen Abb. 3.13 und Abb. 3.14 dargestellt.



**Abb. 3.13:** Enzymatische Modifikation von SL-E<sub>2</sub>-12 mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit 3-OH-Decansäure. Neues Produkt: SL-E<sub>2</sub>-12-di-3-OH-C10



**Abb. 3.14:** Enzymatische Modifikation von SL-E<sub>2</sub>-12 mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit 17-OH-Stearinsäure. Produktgemisch: 60 % Diacylierung und 40 % Monoacylierung (Position 6'' = Acetatgruppe)

Im Vergleich zu den NMR-Spektren des Substrats SL-E<sub>2-12</sub> fallen folgende Veränderungen bei den modifizierten Verbindungen auf (Tabelle 3.6):

Bei SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 fehlt das Singulett bei 2.10 ppm für die Acetylgruppe. An den Positionen C-6' und C-6'' lässt sich die Doppel-Acylierung durch die chemischen Verschiebungen bei 4.46/4.26 ppm bzw. 4.44/4.24 ppm beweisen. Außerdem kann aus den  $\delta$ -Signalen bei 2.40-2.60 ppm (CH<sub>2</sub>-Gruppe zwischen Carboxylat-Gruppe und alkoholischen C-Atom), 4.00-4.07 ppm (Methinproton an sekundärer Alkoholgruppe) und 2.44-2.55 ppm (CH<sub>2</sub>-Gruppe neben alkoholischen C-Atom) auf die ungewöhnliche 3-Hydroxy-Decansäure als Acyl-Substituent geschlossen werden. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum fallen die starken Signale für endständige CH<sub>3</sub>-Gruppen (14.4 ppm), die zusätzlichen Signale für die beiden OH-Gruppen tragenden C-Atome der 3-OH-C10 bei 69.3 ppm und ein starkes Signal (2-fach) für ein Carboxylat-C-Atom bei 173.3 ppm (anstatt des Acetyl-Carboxylat-C-Atoms) auf.

Im Falle des Produktgemisches (Verhältnis 40 %/60 %) aus der enzymatischen Acylierung mit der 17-Hydroxy-Octadecansäure sind folgende NMR-Daten (Tabelle 3.7) signifikant: Das noch (zu ca. 40 %) sichtbare Signal bei 2.10 ppm (s) für eine Acetylgruppe spricht dafür, dass die beiden primären OH-Gruppen der Sophorose nicht komplett mit der 17-Hydroxy-Octadecansäure acyliert worden sind. Hier handelt es sich demnach um SL-E<sub>2-12</sub>-mono-17-OH-C18. Die Werte bei 3.74 ppm (m) und 1.18 ppm (d) sprechen für das Vorliegen einer  $\omega$ -1-Hydroxygruppe einer längeren Acylgruppe [<sup>1</sup>H-NMR]. Bei SL-E<sub>2-12</sub>-di-17-OH-C18 (ca. 60 %) fehlt das markante Signal bei 2.10 ppm; dafür ist die Integralkurve für die Methylenprotonen (1.33 ppm) aufgrund zweier identischer Hydroxyfettsäuren verstärkt [<sup>1</sup>H-NMR]. Hinsichtlich der <sup>13</sup>C-NMR-Daten unterstreichen die ppm-Werte bei 68.6 und 175.3/178.1 bei beiden neuen Glycolipiden das Vorliegen zusätzlicher C-Atome mit Hydroxy- bzw. Carboxylatgruppen.

**Tabelle 3.6:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 (aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multipllett

SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10			
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7	102.5
	C-2'	3.29 dd / 7.9/9.2	83.6
	C-3'	3.59 t / 9.1	77.8
	C-4'	3.33 – 3.35 m	71.5 <sup>a</sup>
	C-5'	3.46 – 3.50 m	75.0 <sup>b</sup>
	C-6'A	4.46 dd / 2.3/12.1 <sup>a</sup>	64.7
	C-6'B	4.26 dd / 5.4/12.1 <sup>a</sup>	-
	C-1''	4.59 d / 7.8	105.5
	C-2''	3.33 – 3.35 m	76.0
	C-3''	3.42 t / 9.1	77.5
	C-4''	3.33 – 3.35 m	71.6 <sup>a</sup>
	C-5''	3.46 – 3.50 m	75.7 <sup>b</sup>
	C-6''A	4.44 dd / 2.3/11.9 <sup>a</sup>	64.8
	C-6''B	4.24 dd / 6.4/11.8 <sup>a</sup>	-
	CH <sub>3</sub> COO-(C-6'')	-	-
Alkohol	C-1	1.24 d / 6.2	21.9
	C-2	3.77 – 3.80 m	78.4
	C-3 A	1.43 – 1.53 m	37.8
	C-3 B	1.63 – 1.68 m	
	C-4 – C-11	1.34 – 1.40 m	23.7 - 33.1
	C-12	0.94 t / 7.0	14.4
Acylrest (2x)	C-1	-	173.3 / 173.3
	C-2	2.40 - 2.60 m	38.1 / 38.2
	C-3	4.00 – 4.07 m	69.3 / 69.3
	C-4	2.44 – 2.50 m	s. C-4-C-11 (Alkohol)
	C-5 – C-9	1.34 – 1.40 m	s. C-4-C-11 (Alkohol)
	C-10	0.94 t / 7.0	14.4

<sup>a,b</sup> austauschbar innerhalb der Spalten

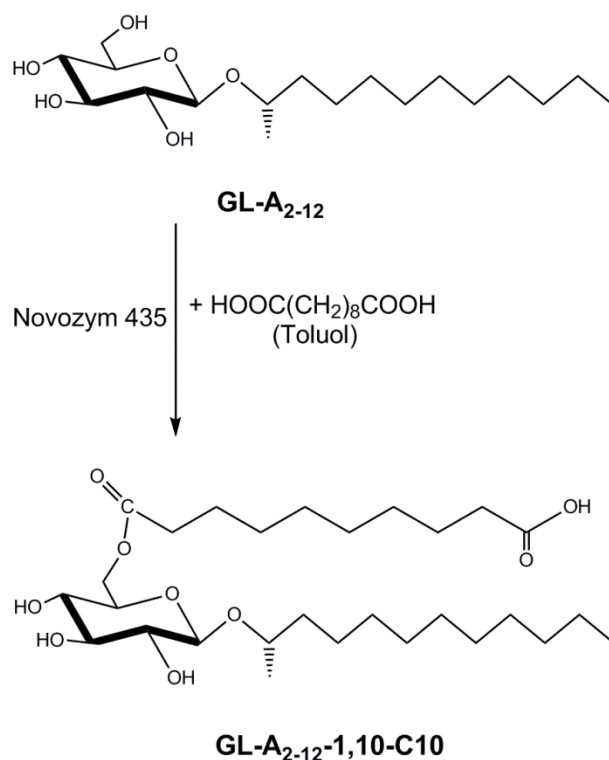


**Tabelle 3.7:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des nicht trennbaren Gemisches aus SL-E<sub>2-12</sub>-mono-17-OH-C18 (40 %) und SL-E<sub>2-12</sub>-di-17-OH-C18 (60 %), (aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		SL-E <sub>2-12</sub> -mono-17-OH-C18 (40%)		SL-E <sub>2-12</sub> -di-17-OH-C18 (60%)	
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) $\delta$ (ppm) / J (Hz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) $\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7	102.5	4.49 d / 7.7	102.5
	C-2'	3.42 dd / 7.6/9.3	83.8	3.42 dd / 7.6/9.3	83.8
	C-3'	3.59 t / 9.1	78.3	3.59 t / 9.1	78.3
	C-4'	3.35 m	71.7	3.35 m	71.7
	C-5'	3.49 m	75.6	3.49 m	75.6
	C-6'A	4.41 dd / 2.1/11.9	72.1	4.41 dd / 2.1/11.9	72.1
	C-6'B	4.2 dd / 5.3/11.9	-	4.2 dd / 5.3/11.9	-
	C-1''	4.59 d / 7.8	105.7	4.59 d / 7.8	105.7
	C-2''	3.29 dd / 7.9/9.2	77.6	3.29 dd / 7.9/9.2	77.6
	C-3''	3.42 t / 9.3	76.1	3.42 t / 9.3	76.1
	C-4''	3.35 m	71.4	3.35 m	71.4
	C-5''	3.49 m	75.0	3.49 m	75.0
	C-6''A	4.45 dd / 2.1/11.8	64.9	4.45 dd / 2.1/11.8	64.9
	C-6''B	4.45 dd / 6.7/11.8	-	4.45 dd / 6.7/11.8	-
	CH <sub>3</sub> COO-(C-6'')	2.10 s	20.3 / 172.6	-	-
Alkohol	C-1	1.24 d / 6.2	21.9	1.24 d / 6.2	21.9
	C-2	3.78 m	77.8	3.78 m	77.8
	C-3 A	1.44 m	37.9	1.44 m	37.9
	C-3 B	1.65 m		1.65 m	
	C-4 – C-11	1.33 m	20.9 – 33.1	1.33 m	20.9 – 33.1
	C-12	0.94 t / 6.9	14.5	0.94 t / 6.9	14.5
Acylrest	C-1	-	175.3	-	175.3, 178.1
(1x oder 2x)	C-2 (C-6')	2.30 t / 7.4	35.3 oder 35.4	2.30 t / 7.4	35.3 oder 35.4
	C-2 (C-6'')	-	-	2.38 t / 7.4	35.3 oder 35.4
	C-3-C-15	1.33 m	20.9 – 33.1	1.33 m	20.9 – 33.1
	C-16	1.65 m	40.2	1.65 m	40.2
	C-17	3.74 m	68.6	3.74 m	68.6
	C-18	1.18 d / 6.2	23.5	1.18 d / 6.2	23.5

### Resultate der Acylierung von GL-A<sub>2-12</sub> mit Sebacinsäure

Wie in Abschnitt 3.1.2.4 beschrieben, wurde bei der enzymatischen Modifikation der Ausgangssubstanz GL-A<sub>2-12</sub> mit Novozym 435 das neue Glycokonjugat GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10 erhalten und via Strukturaufklärung analysiert. In Abb. 3.15 ist diese Reaktion dargestellt.



**Abb. 3.15:** Enzymatische Modifikation von GL-A<sub>2-12</sub> mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit Sebacinsäure. Neues Produkt: GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10

Mit Blick auf das Substrat GL-A<sub>2-12</sub> gibt es bezüglich der NMR-Spektren (Tabelle 3.8) folgende Änderungen in GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10:

Die Acylierung der C-6'-Position wurde durch die Tieffeld-Verschiebung der entsprechenden H-6A und H-6B-Protonen zu Werten von 4.40/4.43 ppm bestätigt. Weiterhin belegen die <sup>1</sup>H-NMR-Signale bei 2.28 ppm mit dem Triplett, dass CH<sub>2</sub>-Gruppen benachbart zu Carboxylatgruppen vorliegen. Außerdem ist dem <sup>13</sup>C-Spektrum zu entnehmen, dass zwei Carboxylatgruppen im Produkt dazu gekommen sind (174.7/177.0 ppm).

**Tabelle 3.8:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von GL-A<sub>2-12</sub> und GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10 (aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD bzw. CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 7:3); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		GL-A <sub>2-12</sub>		GL-A <sub>2-12</sub> -1,10-C10	
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)
Zucker	C-1'	4.36 d / 7.8	103.9	4.32 d / 7.8	102.8
	C-2'	3.18 dd / 7.9/9.1	75.3	3.35 dd / 7.9/9.1	74.0
	C-3'	3.39 t / 8.8	78.1	3.41 t / 9.0	77.9
	C-4'	3.32 t / 9.1	71.7	3.23 t / 9.2	70.7
	C-5'	3.27-3.30 m	77.8	3.44 – 3.47 m	76.8
	C-6'A	3.69-3.72 dd / 5.5/11.9	62.8	4.40 dd / 2.1/11.9	64.0
	C-6'B	3.88-3.90 dd / 2.3/11.9	-	4.23 dd / 6.5/11.8	-
Alkohol	C-1	1.27 d / 6.3	21.9	1.23 d / 6.2	21.6
	C-2	3.83 – 3.87 m	77.6	3.73 – 3.76 m	74.1
	C-3 A	1.64 – 1.68 m	37.7	1.58 – 1.62 m	36.9
	C-3 B	1.45 – 1.48 m		1.37 – 1.41 m	-
	C-4 – C-11	1.34 – 1.44 m	23.7 – 33.1	1.26 – 1.31 m	22.9 – 32.2
	C-12	0.94 t / 7.0	14.4	0.88 t / 6.9	14.2
Sebacin	C-1''	-	-	-	174.7
säure-	C-2''	-	-	2.28 t / 7.5	34.4
Rest	C-3''	-	-	1.58 – 1.62 m	s. C-4-C-11 (Alkohol)
	C-4'''-C-7''	-	-	1.26 – 1.31 m	s. C-4-C-11 (Alkohol)
	C-8''	-	-	1.58 – 1.62 m	s. C-4-C-11 (Alkohol)
	C-9''	-	-	2.28 t / 7.5	34.4
	C-10''	-	-	-	177.0

**Massenspektrometrische Daten aller SL-E<sub>2-12</sub>- bzw. GL-A<sub>2-12</sub>-Abkömmlinge**

Die erhaltenen NMR-Daten wurden anschließend noch durch die Messung der Massenspektren der neuen Substanzen abgesichert (Tabelle 3.9).

**Tabelle 3.9: Massenspektrometrische Daten von allen neuen Glykokonjugaten**

Komponente	[M + Na] <sup>+</sup> <sub>gefunden</sub>	[M + Na] <sup>+</sup> <sub>kalkuliert</sub>	Summenformel
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C10	729,45*	729,4396	C <sub>36</sub> H <sub>66</sub> O <sub>13</sub>
SL-E <sub>2-12</sub> -di-C10	841,57*	841,5648	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>13</sub>
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C18	841,57*	841,5648	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>13</sub>
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	873,5633	873,5546	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>15</sub>
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-17-OH-C18	857,5585	857,5597	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>14</sub>
SL-E <sub>2-12</sub> -di-17-OH-C18	1097,8040	1097,8050	C <sub>60</sub> H <sub>114</sub> O <sub>15</sub>
GL-A <sub>2-12</sub> -1,10-C10	555,3501	555,3504	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>

\*aufgenommen mit Micromass QTOF MS

**Quantitative Daten zu den Biokatalyse-Versuchen**

Mit den ermittelten molekularen Massen der neuen Glykokonjugate wurde die Produktausbeute, bezogen auf die jeweilige Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> (50 mg) oder GL-A<sub>2-12</sub> (50 mg), berechnet. Die praktische Ausbeute wurde anschließend mit der theoretischen ins Verhältnis gesetzt (Tabelle 3.10).

**Tabelle 3.10: Quantitative Daten zu den enzymatischen Reaktionen an SL-E<sub>2-12</sub> bzw. GL-A<sub>2-12</sub>**

Substrate (eingesetzte Mengen in mg)	Glykokonjugat	Menge (mg)	Ausbeute (%)
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + Decansäure (100)	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C10	*	*
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + Decansäure (100)	SL-E <sub>2-12</sub> -di-C10	10	13
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + Stearinsäure (100)	SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C18	*	*
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + 3-OH-Decansäure (100)	SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	20	25
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + 17-OH-Stearinsäure (100)	SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	13,5	16
SL-E <sub>2-12</sub> (50) + H <sub>2</sub> O	GL-A <sub>2-12</sub>	14	44
GL-A <sub>2-12</sub> (50) + Sebacinsäure (50)	GL-A <sub>2-12</sub> -1,10-C10	10,5	15

\*aufgrund der schnellen Wasseranziehung konnten keine Werte angegeben werden

### 3.1.4 Physicochemische Charakterisierung der modifizierten Glycolipide

Nach der enzymatischen Modifikation und der anschließenden Aufreinigung der neuen Glycokonjugate wurden die ober- und grenzflächenaktiven Eigenschaften in wässrigen Lösungen untersucht. Zudem erfolgte eine Bestimmung der Emulsionsstabilität in w/o-Emulsionen und o/w-Emulsionen mit verschiedenen hydrophoben Phasen.

#### 3.1.4.1 Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser

Für diese Bestimmung mittels Tensiometer wurden die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub>, die gewonnenen neuartigen Glycolipide und die zur Modifikation verwendeten ungewöhnlichen Fettsäuren eingesetzt und bei einer Temperatur von 25 °C vermessen. Außerdem wurde zusätzlich die kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) der Verbindungen bestimmt. Dazu wurden Konzentrationen von 0,5 mg/l bis 200 mg/l verwendet (Abschnitt 2.14.1). Anschließend erfolgte ein Ergebnisvergleich von Ausgangssubstanz und den neu erhaltenen Glycolipiden.

Die Oberflächenspannungen des Wassers unter dem Einfluss der neuen Glycokonjugate aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit Decan- und Stearinsäure wurden gegen die eingesetzte Konzentration in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3.16). Aus diesem konnten die minimalen Oberflächenspannungen am Punkt der kritischen Mizellbildungskonzentration abgelesen werden, welche in Tabelle 3.11 zusammengefasst sind.

Es war zu beobachten, dass die mit der Decansäure acylierten neuen Substanzen (SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-di-C10) eine niedrigere Oberflächenspannung von Wasser bewirken als SL-E<sub>2-12</sub>-mono-C18. Diese führte zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 36 mN/m. Zum Vergleich wurde die eingesetzte Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> dargestellt, welche eine Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser (72 mN/m) auf 31 mN/m bewirkte.

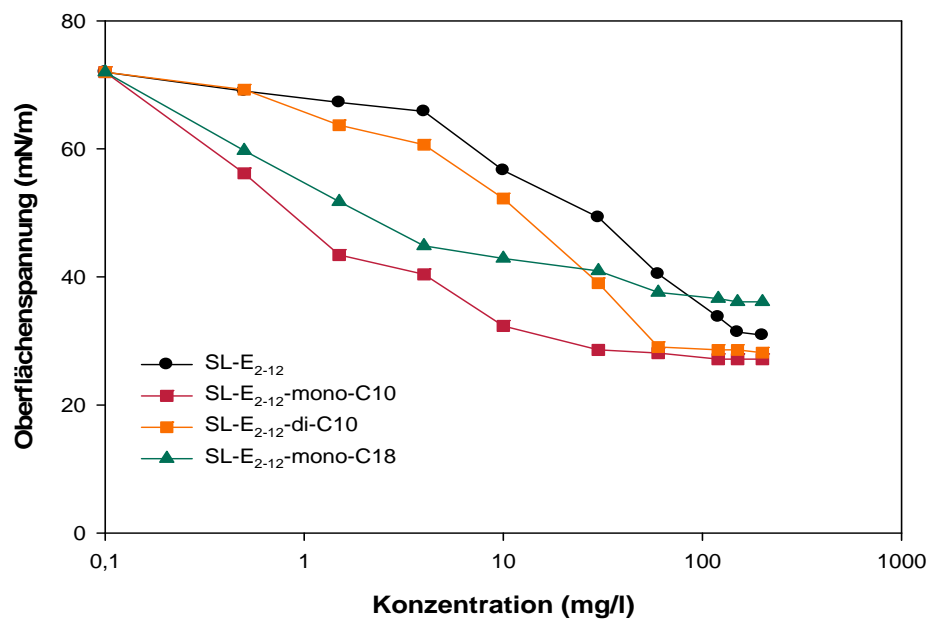


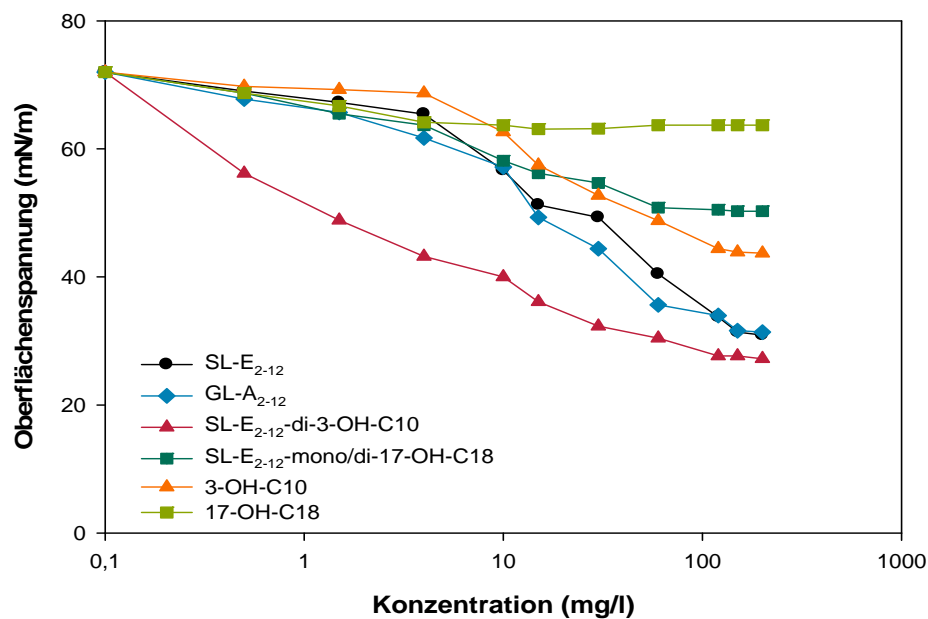
Abb. 3.16: Einfluss der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> und der neuartigen Glycolipide aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit Decan- bzw. Stearinsäure auf die Oberflächenspannung von Wasser bei 25 °C

Tabelle 3.11: Daten zum Einfluss der SL-E<sub>2-12</sub>-Abkömmlinge auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Oberflächenspannung	Kritische Mizellbildungs- konzentration cmc (mg/l)
	$\sigma$ (mN/m)	
SL-E <sub>2-12</sub>	31	200
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C10	27	150
SL-E <sub>2-12</sub> -di -C10	28	120
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-C18	36	150

Für die neuartigen Glycolipide aus Lipase-katalysierter Acylierung mit 3-OH-Decansäure oder 17-OH-Stearinsäure wurden die Oberflächenspannung ebenfalls gemessen (Abb. 3.17) und die kritische Mizellbildungskonzentration (Tabelle 3.12) bestimmt.

Die Oberflächenspannung der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> wurde in Abb. 3.17 zusammen mit den neuen Glycokonjugaten GL-A<sub>2-12</sub> aus der Hydrolyse, SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 aus der Acylierung mit den Fettsäuren 3-OH-C10 und 17-OH-C18 und die Fettsäuren selbst dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass das Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> eine ähnliche gute Erniedrigung der Oberflächenspannung zeigte wie die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub>.



**Abb. 3.17:** Einfluss der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> und der neuartigen Glycolipide aus der Hydrolyse (GL-A<sub>2-12</sub>), aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Decansäure und der acylierten Fettsäuren auf die Oberflächenspannung von Wasser bei 25 °C

Weiterhin war zu sehen, dass SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 eine wesentlich stärkere Absenkung der Oberflächenspannung von Wasser (72 mN/m) auf 27 mN/m im Gegensatz zu SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 zeigte. Diese bewirkte nur eine Erniedrigung auf 50 mN/m, was durch die längere Fettsäureketten bewirkt wurde. Die reinen Fettsäuren 3-OH-C10 und 17-OH-C18 wurden ebenfalls vermessen, um einen Vergleich zu den Glykokonjugaten und so den Einfluss des Zuckeranteils in diesen Molekülen durchzuführen. Aus den Daten in Tabelle 3.12 wird deutlich, dass die Fettsäuren ebenfalls eine Erniedrigung der Oberflächenspannung bewirken, die aber mit Werten von 44 mN/m für 3-OH-C10 bzw. 64 mN/m für 17-OH-C18 wesentlich höher ausfallen als bei den entsprechenden Glykokonjugaten.

**Tabelle 3.12:** Daten zum Einfluss der SL-E<sub>2-12</sub>-Abkömmlinge bzw. ungewöhnlicher freier Fettsäuren auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Oberflächenspannung	Kritische Mizellbildungs- konzentration cmc (mg/l)
	$\sigma$ (mN/m)	
SL-E <sub>2-12</sub>	31	200
GL-A <sub>2-12</sub>	31	200
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	27	200
SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	50	150
3-OH-C10	44	150
17-OH-C18	64	60

### 3.1.4.2 Bestimmung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan

Die Ermittlung der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan wurde ebenfalls mit einem Tensiometer ermittelt. Auch hier wurde die Beeinflussung durch die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub>, die gewonnenen neuartigen Glycolipide (aus Hydrolyse bzw. der Acylierung mit den ungewöhnlichen Fettsäuren resultierend) und die zur Modifikation eingesetzten ungewöhnlichen Fettsäuren bei einer Temperatur von 25 °C untersucht (Abschnitt 2.14.2). Niedrige Grenzflächenspannungen zwischen Wasser und n-Hexadecan bewirkten GL-A<sub>2-12</sub> und SL-E<sub>2-12</sub> mit 3 mN/m (Abb. 3.18). Die Werte für die beiden neuen Substanzen lagen etwas höher (Tabelle 3.13). Die Fettsäuren selbst zeigten eine wesentlich geringere Erniedrigung der Grenzflächenspannung auf 21 mN/m bzw. 30 mN/m.



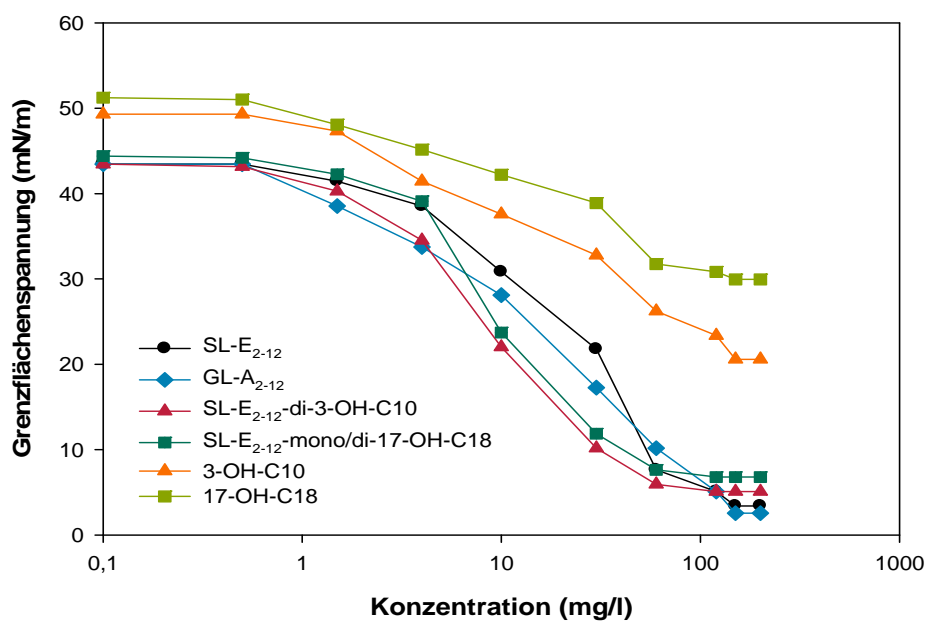


Abb. 3.18: Einfluss der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> und der neuartigen Glycolipide aus der Hydrolyse (GL-A<sub>2-12</sub>), der Lipase-katalysierten Acylierung mit 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Decansäure und der acylierten Fettsäuren auf die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan bei 25 °C

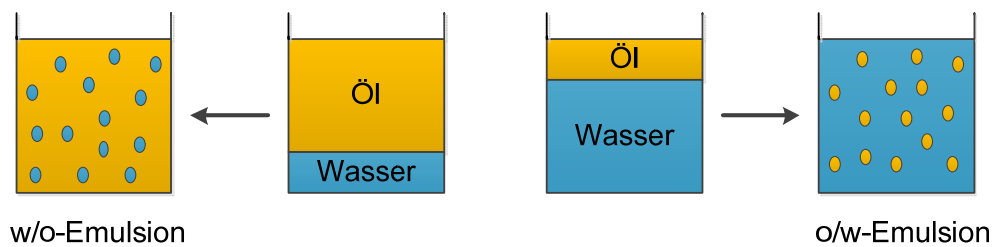
Tabelle 3.13: Daten zum Einfluss der SL-E<sub>2-12</sub>-Abkömmlinge bzw. ungewöhnlicher freier Fettsäuren auf die Erniedrigung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Grenzflächenspannung $\gamma$ (mN/m)
SL-E <sub>2-12</sub>	3
GL-A <sub>2-12</sub>	3
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	5
SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	7*
3-OH-C10	21
17-OH-C18	30

\* möglicherweise nur SL-E<sub>2-12</sub>-mono-17-OH-C18 gelöst

### 3.1.4.3 Bestimmung der Emulsionsstabilität

Emulsionen sind Zweistoff-Systeme, die aus einer, meist im Überschuss vorhandenen, kontinuierlichen oder äußeren Phase und einer in dieser äußeren Phase dispergierten Flüssigkeit, bestehen. Je nachdem, welche Phase als kontinuierliche Phase vorliegt, wird eine Unterscheidung in Wasser-Öl- (w/o) oder Öl-Wasser-Emulsionen (o/w) gemacht (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19: Emulsionstypen in wässrigen Systemen (modifiziert nach (Heusch 1993))**

In Abb. 3.20 wurde exemplarisch die Stabilität der o/w-Emulsionen mit den zu emulgierenden verschiedenen hydrophoben Phasen in Gegenwart der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> und des Glucoselipids GL-A<sub>2-12</sub> über einen Zeitraum von 4 h dargestellt. Dabei war zu erkennen, dass das neu gebildete Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> eine bessere Stabilitätswirkung aufweist als SL-E<sub>2-12</sub>. Die beste Wirkung zeigte sich bei der o/w-Emulsion mit Sonnenblumenöl als hydrophober Phase. Die optische Dichte lag hier zwischen 1 und 2 und ist damit als gute stabilisierende Wirkung von GL-A<sub>2-12</sub> zu beurteilen.

Ebenfalls exemplarisch wurde die Stabilität der w/o-Emulsionen mit den verschiedenen Ölen im Überschuss sowie Wasser als zu emulgierende Phase in Gegenwart von SL-E<sub>2-12</sub> und des Glucoselipids GL-A<sub>2-12</sub> über einen Zeitraum von 4 h dargestellt (Abb. 3.21). Hier konnte eine ähnliche Wirkung der beiden Substanzen SL-E<sub>2-12</sub> und GL-A<sub>2-12</sub> beobachtet werden. Sowohl die w/o-Emulsion mit Mineralöl als auch mit Sonnenblumenöl zeigt eine sehr gute Stabilität innerhalb der 4 h, da nach dieser Zeit kaum ein Absinken der optischen Dichte zu beobachten war (OD-Werte zwischen 2,5 und 3).

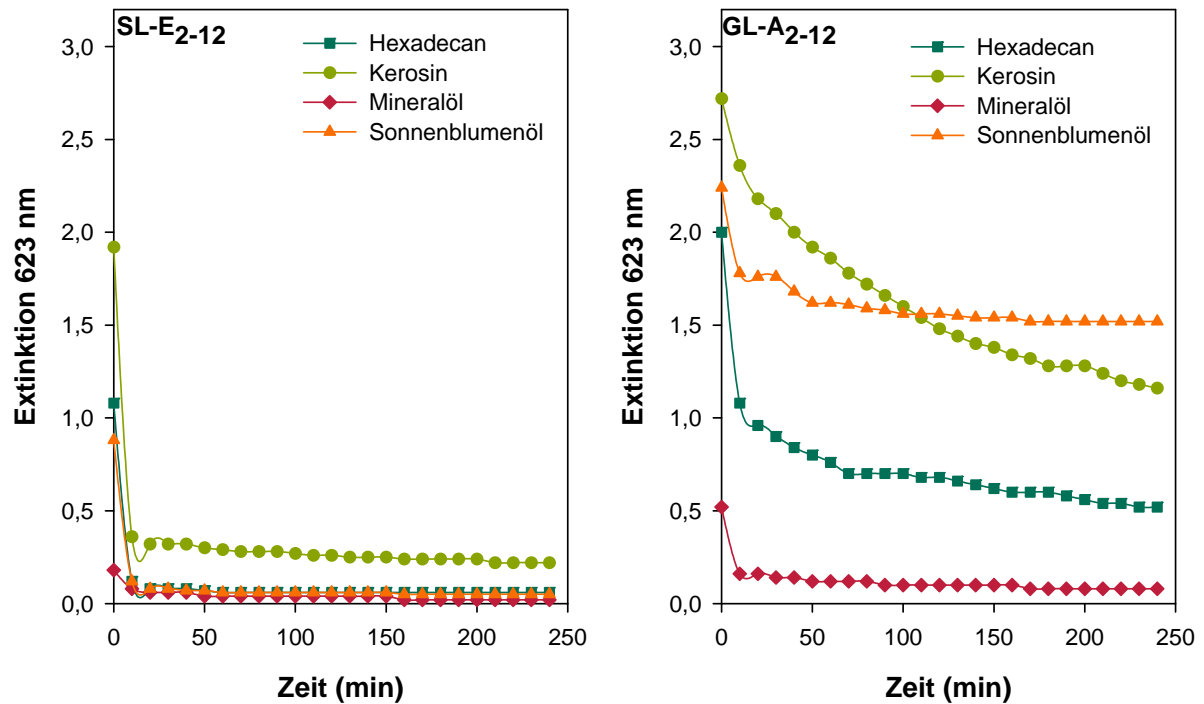


Abb. 3.20: Stabilitäten der o/w-Emulsionen über 4 h ( $OD_{623\text{ nm}}$ -Werte) mit verschiedenen hydrophoben Phasen, links: Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> (0,125 g/l), rechts: Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> (0,125 g/l)

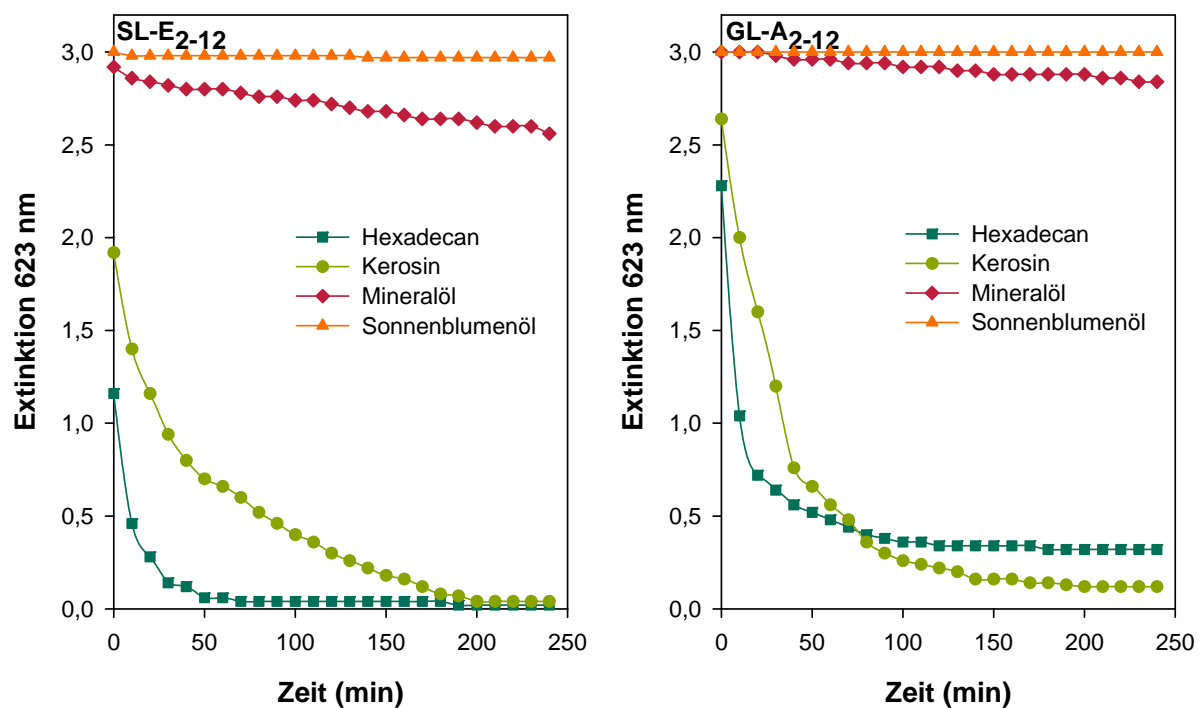


Abb. 3.21: Stabilitäten der w/o-Emulsionen über 4 h ( $OD_{623\text{ nm}}$ -Werte) mit verschiedenen hydrophoben Phasen, links: Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> (0,125 g/l), rechts: Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> (0,125 g/l)

Die gemessene Stabilität der o/w-Emulsionen und der w/o-Emulsionen wurde in Tabelle 3.14 für SL-E<sub>2-12</sub>, die drei neuen Glycokonjugate und die beiden verwendeten ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-Decansäure und 17-OH-Stearinsäure zusammengefasst. Daraus konnte abgeleitet und in den Abb. 3.20 und Abb. 3.21 beobachtet werden, dass die w/o-Emulsionen mit den Testsubstanzen eine höhere Stabilität aufweisen als o/w-Emulsionen. Besonders in w/o-Emulsionen mit Sonnenblumenöl zeigten alle getesteten Substanzen eine emulgierende Wirkung, d.h. sie sind als Emulgatoren geeignet. Sowohl in o/w- als auch in w/o-Emulsionen mit Hexadecan und Kerosin konnte für die Substanzen keine emulgierende Wirkung gefunden werden.

**Tabelle 3.14: Bewertung der Stabilität von o/w-Emulsionen und w/o-Emulsionen von Wasser/Öl-Gemischen unter Einfluss von Glycolipiden und ungewöhnlichen Fettsäuren.**

Hydrophobe Phasen (Öle): **Hexadecan**, **Kerosin**, **Mineralöl**, **Sonnenblumenöl**.

Messung der optischen Dichte bei 623 nm nach 4 h. OD<sub>623nm</sub> = 2-3 → sehr gute stabilisierende Wirkung (++), OD<sub>623nm</sub> = 1-2 → gute Stabilisierung (+), OD<sub>623nm</sub> < 1 → kaum stabilisierende Wirkung (-)

Testsubstanz	o/w-Emulsionen		w/o-Emulsionen	
	Mineralöl	Sonnenblumenöl	Mineralöl	Sonnenblumenöl
SL-E <sub>2-12</sub>	-	-	++	++
GL-A <sub>2-12</sub>	-	+	++	++
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	-	-	-	++
SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	-	-	-	++
3-OH-C10	-	-	-	+
17-OH-C18	-	-	-	+

### 3.1.5 Biologische Aktivitäten der modifizierten Glycolipide

Die antimikrobielle Wirkung von Glycolipiden ist schon länger bekannt und wurde sowohl für klassische Sophoroselipide als auch für Rhamnoselipide nachgewiesen (Lang et al. 1989).

In der folgenden Versuchsreihe wurde zunächst der Agardiffusionstest mit verschiedenen gram-negativen (z.B. *E. coli*, *P. aeruginosa*) und gram-positiven Bakterien (z.B. *B. megaterium*, *B. subtilis*), Pilzen (z.B. *U. maydis*) und der Alge *C. fusca* durchgeführt.

Weitere Versuche, wie der *in vitro*-Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität und der *in vivo* „two stage mouse skin carcinogenesis“-Test, wurden von Dr. H. Tokuda von der Kanazawa Universität in Japan durchgeführt. Diese beiden Tests wurden bereits in einer vorangegangenen Dissertation mit dem Thema „Biotechnologische Produktion und Modifikation mariner Glycoglycerolipide“ (Lurtz 2006) erfolgreich genutzt.

#### 3.1.5.1 Agardiffusionstest

Der Hemmhoftest wurde, wie im Abschnitt 2.15.1 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden u.a. das Bakterium *S. capitis* subsp. *capitis* und die Hefe *C. magnoliae* eingesetzt, die als Ersatzorganismen für die krankheitserregenden S2-Mikroorganismen *S. epidermidis* und *C. albicans* dienten. Dabei kommt *S. capitis* auf der Kopfhaut vor und ist mit *S. epidermidis* verwandt und kann daher gut als Alternative zum S2-Organismus und somit als Modellorganismus genutzt werden (Kloos et al. 1991). Die Hefe *C. albicans* ist der Verursacher von Hauterkrankungen und von Schleimhäuten und gehört ebenfalls zur Risikoklasse 2. Daher wurde hier auch nach einer anderen Möglichkeit gesucht und die Hefe *C. magnoliae* ausgewählt, die ursprünglich in Magnolienblüten gefunden wurde und in der natürlichen Mikroflora im Magen-Darm-Trakt von Bienen vorkommt (Phaff und Starmer 1987). Diese beiden Mikroorganismen wurden nach den Erkenntnissen von Lämmle ausgewählt (Lämmle 1997). Als Vergleichssubstanz wurde Penicillin G eingesetzt, welches gegenüber gram-positiven eine sehr gute und gegen gram-negative Bakterien eine geringere Wirkung zeigt.

Die Bewertung des Agardiffusionstests erfolgte mittels Messung des Hemmhofdurchmessers. Dabei wurde ein Hemmhofdurchmesser von > 10 mm als sehr gute Wirkung der Testsubstanz auf den jeweiligen Organismus gewertet (++). In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse für alle Testsubstanzen mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 600 µg zusammengefasst.

Die Auswertung des Agardiffusionstests verdeutlichte, dass sowohl SL-E<sub>2-12</sub>, das Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> und die beiden Substanzen aus der Acylierung mit den ungewöhnlichen Fettsäuren als auch die 3-OH-Decansäure eine inhibierende Wirkung auf die gram-positiven Bakterien *B. megaterium* und *B. subtilis* besitzen. Eine hemmende Wirkung auf *S. capitis* war indessen bei den Substanzen SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 und auch bei den zur Acylierung eingesetzten Fettsäuren zu beobachten. Auf die Hefe *C. magnoliae* haben alle Testsubstanzen bis auf 17-OH-C18 einen Effekt gezeigt. Eine Wirksamkeit der Testsubstanzen auf die Pilze *E. repens*, *M. microspora* und *U. maydis* und auf die gram-negativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* konnte nicht nachgewiesen werden. Die besten inhibitorischen Effekte konnten somit für die gram-positiven Bakterien *B. megaterium* und *B. subtilis* gefunden werden. Bezüglich der Alge *C. fusca* wurde in keinem Fall eine Wachstumshemmung beobachtet, so dass hier Schäden für die Umwelt ausgeschlossen werden können.

**Tabelle 3.15: Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Bakterien, Pilzen und der Alge *C. fusca*.** Substanzmenge der Testsubstanz von 600 µg; (++) Hemmhofdurchmesser > 10 mm, (+) Hemmhofdurchmesser < 10 mm, (-) kein Hemmhof. Pen G-Wirkung zum Vergleich: Hemmhofdurchmesser > 15 mm bei gram-positiven Bakterien dieser Tabelle.

Testorganismus	Testsubstanzen					
	SL-E <sub>2-12</sub>	GL-A <sub>2-12</sub>	SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	3-OH-C10	17-OH-C18
<b>Bakterien</b>						
<i>Bacillus megaterium</i>	+	++	+	+	++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	++	+	++	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	+	+	+	+
<b>Pilze</b>						
<i>Candida magnoliae</i>	+	+	+	+	++	-
<i>Eurotium repens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mycotypha microspora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ustilago maydis</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Alge</b>						
<i>Chlorella fusca</i>	-	-	-	-	-	-

### 3.1.5.2 Anti-Tumor-Promoting-Aktivität

Diesem Test (Abschnitt 2.15.2) wurden alle isolierten reinen Produkte GL-A<sub>2-12</sub>, SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10, SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 und außerdem noch das Substrat SL-E<sub>2-12</sub> und die eingesetzten Fettsäuren unterzogen (Tabelle 3.16).

**Tabelle 3.16:** Einfluss verschiedener Substanzen auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)

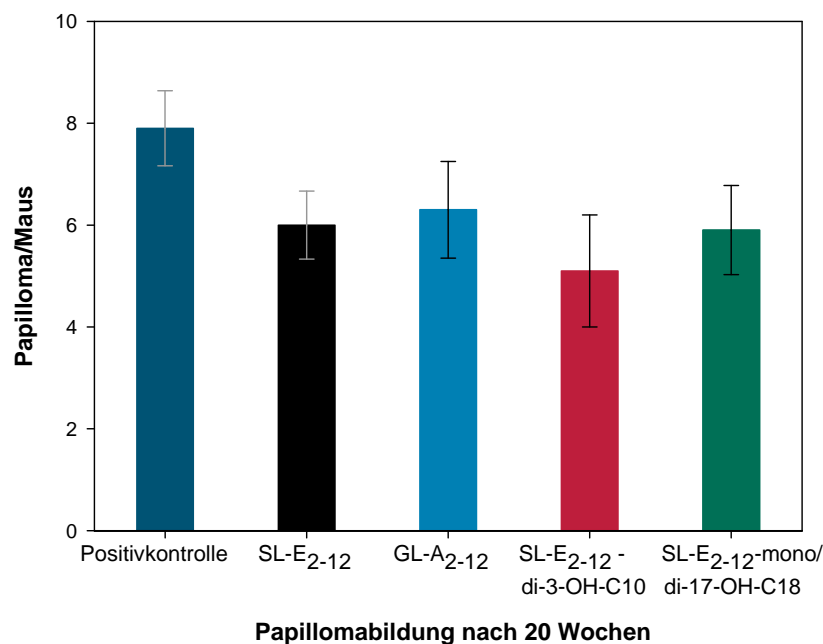
Substanzen	Konzentration (Molverhältnis/TPA)			
	% Kontrolle (% Überlebensrate)			
	1000	500	100	10
SL-E <sub>2-12</sub>	12,3 (70) ± 0,4	53,6 ± 1,5	82,3 ± 2,1	100 ± 2,0
GL-A <sub>2-12</sub>	14,9 (70) ± 0,7	57,0 ± 1,5	84,1 ± 1,9	100 ± 2,1
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	10,1 (70) ± 0,5	50,6 ± 1,2	79,9 ± 1,3	100 ± 1,9
SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	12,5 (70) ± 0,6	56,3 ± 1,5	82,9 ± 1,3	100 ± 2,1
3-OH-C10	11,3 (70) ± 0,6	52,5 ± 1,2	81,3 ± 1,5	100 ± 2,0
17-OH-C18	14,6 (70) ± 0,8	56,7 ± 1,4	84,4 ± 2,0	100 ± 2,2
HGG*	0 (70) ± 0,5	20,3 ± 1,3	38,5 ± 1,5	72,1 ± 0,4

\* Heptyl-Galactosyl-Glycerid (Colombo et al. 2002)

Diese Untersuchung zeigte, dass im Vergleich zu einem Literaturwert (Colombo et al. 2002) vor allem das neue Glycokonjugat SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 ein gutes Ergebnis hervorrief. Dabei wurde beobachtet, dass es eine starke Inhibierung der Tumoraktivität bewirkt. Bei einer 1000fachen Konzentration der Substanz gegenüber dem Tumorpromotor TPA konnten nur noch 10,1 % Epstein-Barr-Virus positive Zellen beobachtet werden. Zusätzlich zu der guten Wirkung als Anti-Tumor-Promoting-Reagens wurde eine hohe Überlebensrate (70 %) ermittelt, was einer geringen Zytotoxizität gegenüber den Raji-Zellen entsprach. Das Substanzgemisch SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 zeigte ähnlich gute Eigenschaften wie das Substrat SL-E<sub>2-12</sub>. Dagegen konnte mit GL-A<sub>2-12</sub> eine etwas geringere Wirkung mit noch 14,9 % EBV-positiven Zellen beobachtet werden. Dennoch ist es eine wirksame Substanz und zeigt eine gute Überlebensrate der Raji-Zellen. Zu Vergleichszwecken wurden die eingesetzten ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-C10 und 17-OH-C18 ebenfalls eingeschlossen, um deren separate Wirkung zu testen. Dabei war zu erkennen, dass diese ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Tumoraktivität zeigten.

### 3.1.5.3 *In vivo* -„two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test

Da die neuen Glycokonjugate und auch die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> sehr gute Eigenschaften u.a. im *in-vitro*-Test aufwiesen, wurde mit diesen Substanzen auch ein *in vivo*-Test durchgeführt. Dazu wurden 10 weibliche fünf Wochen alte Mäuse mit den neuen Glycokonjugaten behandelt und anschließend über 20 Wochen beobachtet (Abschnitt 2.15.3). Für die Beurteilung der Wirksamkeit wurde die Anzahl der Geschwüre pro Maus nach 20 Wochen betrachtet (Abb. 3.22; siehe Anhang).



**Abb. 3.22:** Einfluss der Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> ( $6 \pm 0,67$ ) und der neuen Glycokonjugate auf die durchschnittliche Anzahl der Papilloma pro Maus nach 20 Wochen in Bezug auf die Positivkontrolle ( $7,9 \pm 0,74$ ) ( $P < 0,005$ )

Sowohl die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub> als auch die neuen Glycokonjugate konnten die Papillomabildung unterdrücken und es konnten somit weniger als 7,9 ( $\pm 0,74$ ) Papilloma pro Maus (Positivkontrolle) nach 20 Wochen nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied (studentischer *t*-Test ( $P < 0,005$ )) der Testsubstanzen zur Positivkontrolle konnte ab Woche 16 beobachtet werden. Nach der Testzeit von 20 Wochen konnte die wirksamste Substanz, SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10, die Papilloma-Anzahl auf 5,1 ( $\pm 1,10$ ) reduzieren; sie inhibiert somit die Tumorpromotion. Die Glycokonjugate SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 und GL-A<sub>2-12</sub> konnten die Papilloma-Anzahl auf 5,9 ( $\pm 0,88$ ) bzw. 6,3 ( $\pm 0,95$ ) reduzieren und zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle.



### 3.1.6 Bilanz zum Abschnitt 3.1

Durch die enzymatischen Modifikationsexperimente mit SL-E<sub>2-12</sub> als Substrat konnten sieben neue Verbindungen aufgefunden werden und mittels NMR- und MS-Analyse deren Struktur aufgeklärt werden. Dabei entstand im wässrigen System unter Verwendung der  $\beta$ -Glucuronidase das Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub>. Dieses Glucoselipid wurde erfolgreich durch die Lipase Novozym 435 mit der Sebacinsäure acyliert. Die Lipase-katalysierten Acylierungen mit Stearinsäure bzw. Decansäure ergaben ein bzw. zwei neue Produkte. Unter Verwendung der ungewöhnlichen 3-OH-Decansäure bzw. der 17-OH-Stearinsäure konnte jeweils ein Produkt aufgefunden werden. Das Produkt aus der Acylierung mit der 17-OH-Stearinsäure SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18 konnte als Gemisch identifiziert werden, wobei der Mono-Anteil 40 % und der Di-Anteil 60 % ausmacht. Diese durch NMR- und MS-Analyse aufgeklärten neuen Glycokonjugate wurden anschließend durch physicochemische Messungen (z.B. Ober- und Grenzflächenspannung) und biologische Aktivitätstests (z.B. Anti-Tumor-Promoting-Aktivität) charakterisiert. SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 zeigte dabei sehr gute ober- bzw. grenzflächenaktive Eigenschaften und eine recht gute Wirkung bei der Inhibierung der Tumorpromotion.

## 3.2 Projektteil: Mannosylerythritol-Lipide

Für die Nutzung der Mannosylerythritol-Lipide für enzymatische Modifikationen wurden diese zunächst mit Hilfe von *Pseudozyma aphidis* unter der Verwendung von Sojaöl als Co-Substrat hergestellt. Nach der Aufarbeitung standen MEL-A und MEL-B als Substrat für die jeweilige Modifikationsreaktion zur Verfügung.

### 3.2.1 Kultivierung, Isolierung und Aufarbeitung der Ausgangssubstanzen für die nachfolgenden Modifikationen

Auf die Kultivierung mit Sojaöl als Co-Substrat über 10 Tage folgten verschiedene Extraktionsschritte (Abschnitt 2.8.4), um überschüssige Fette aus dem MEL-Produkt zu entfernen und eine Aufreinigung zu erzielen. Danach konnte der MEL-Anteil bestimmt werden, welcher bei ca. 3 g/l lag.

Die Trennung in die Einzelkomponenten, ausgehend vom MEL-Produkt, wurde mittels MPLC erreicht, wobei pro Lauf 1 g Rohprodukt eingesetzt werden konnte. Dabei wurden MEL-A und MEL-B als Hauptkomponenten isoliert, die dann für die folgenden Modifikationen genutzt werden konnten. Für MEL-A konnten durchschnittlich 0,16 g und für MEL-B 0,07 g aus der Trennung von 1 g MEL-Rohprodukt mittels MPLC gewonnen werden (Abb. 3.23).

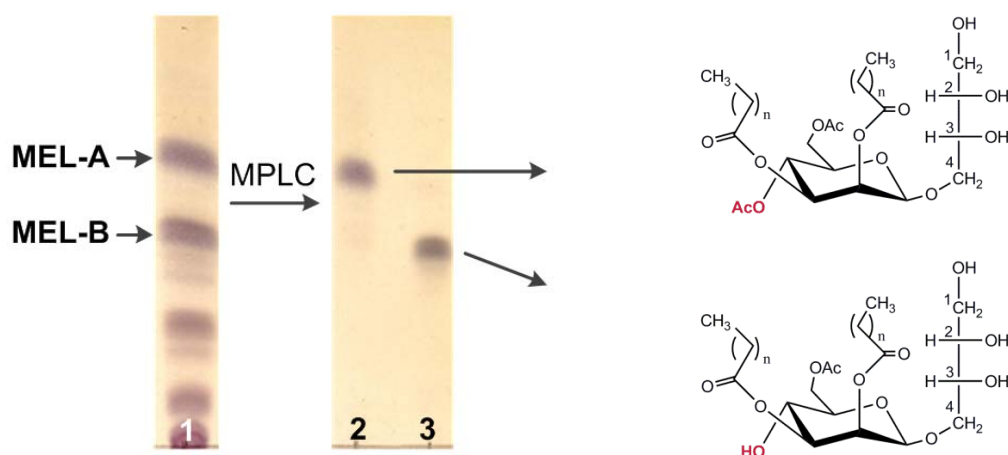


Abb. 3.23: NP-

DC des 1) MEL-Rohprodukts aus der Kultivierung mit Sojaöl als Co-Substrat mit MEL-A und MEL-B als Hauptkomponenten 2/3) MEL-A und MEL-B nach der Trennung mittels MPLC und jeweils mit nebenstehender bekannter Struktur ( $n = 6-12$ ). 10  $\mu$ l Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:10:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

### 3.2.2 Enzymatische Modifikation an Mannosylerythritol-Lipiden

Die zuvor getrennten Komponenten MEL-A und MEL-B wurden für die Glycosidase-katalysierte Mannose-Abspaltung und für verschiedene Lipase-katalysierte Acylierungen eingesetzt. Die Mannose-Abspaltung wurde im Phosphatpuffer unter Verwendung verschiedener Glycosidasen, u.a.  $\beta$ -Mannosidase und  $\beta$ -Glucuronidase, angestrebt, aber es konnte keine Reaktion beobachtet werden.

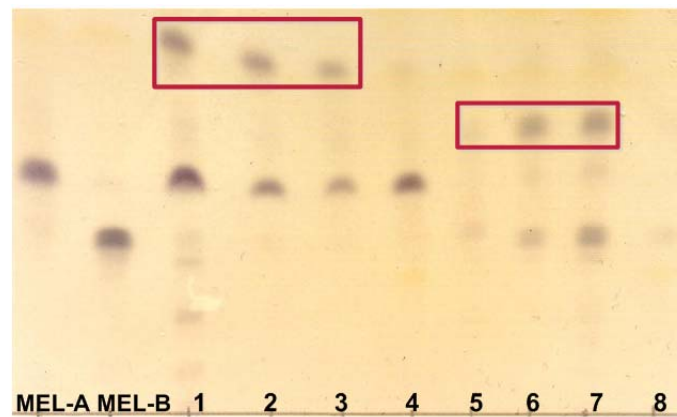
Für die Acylierungen wurden verschiedene Lipasen im organischen Lösungsmittel Toluol eingesetzt. Zudem wurden die ungewöhnlichen Fettsäuren (*R*)-3-OH-C10 aus den Rhamnoselipiden und (*S*)-17-OH-C18 aus dem klassischen Sophoroselipid genutzt.

#### 3.2.2.1 Lipase-katalysierte Acylierungen

Als Lösungsmittel wurde aufgrund der Erfahrung aus dem Projektteil der Alkyl-Sophoroside auf Toluol zurückgegriffen, was sich nach den ersten Vorversuchen hier ebenfalls als geeignet herausstellte. Die entsprechende Reaktionstemperatur wurde durch diverse Tests mit verschiedenen Temperaturen bei z.B. 60 °C und 70 °C ermittelt. Dabei konnte für Reaktionen mit der 3-OH-Decansäure ein Temperaturoptimum von 70 °C und mit 17-OH-C18 ein Optimum von 60 °C gefunden werden (ohne Abbildung). Anschließend galt es die beste Lipase (Tabelle 2.2) zu finden.

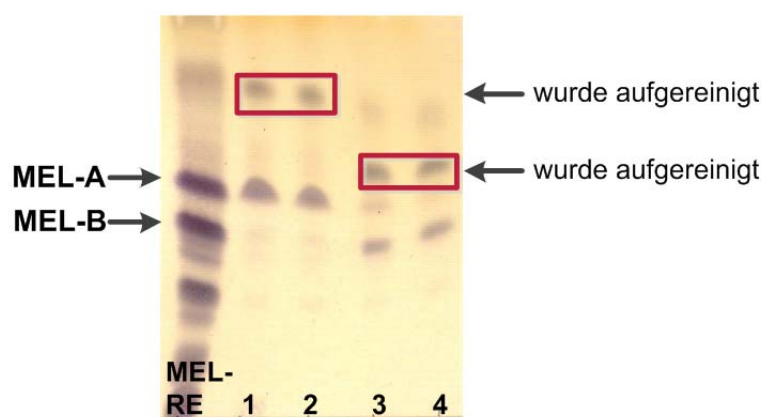
Der Vortest dafür wurde sowohl mit MEL-A als auch mit MEL-B als Ausgangssubstanz und mit den Lipasen Novozym 435, IM 20, Lipase aus *M. miehei* und Novo 388 durchgeführt (Abb. 3.24). Bei der Reaktion mit MEL-A und den Lipasen Novozym 435, IM 20 bzw. der Lipase aus *M. miehei* war jeweils eine unpolarere neue Substanz zu beobachten, wobei die Reaktion mit Novozym 435 den besten Umsatz von MEL-A in ein neues Produkt erzielte (Abb. 3.24, Spur 1). Daher wurde diese Lipase für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Wie bei der Reaktion mit MEL-A war auch in der Reaktion mit MEL-B eine neue Substanz mit Novozym 435, IM 20 bzw. die Lipase aus *M. miehei* zu sehen, wobei das Produkt unter Verwendung von Novozym 435 hier nicht den besten Umsatz in ein neues Glycokonjugat forcierte, sondern mit der Lipase aus *M. miehei* (Abb. 3.24, Spur 7) ein besseres Ergebnis zu beobachten war. D.h., für weitere Versuche wurde die Lipase aus *M. miehei* verwendet.



**Abb. 3.24:** NP-DC des Vortests der Lipase-katalysierten Acylierung von MEL-A und MEL-B mit 3-OH-Decansäure mit 4 verschiedenen Enzymen: 1) MEL-A + Novozym 435, 2) MEL-A + IM 20, 3) MEL-A + Lipase aus *M. miehei*, 4) MEL-A + Novo 388, 5) MEL-B + Novozym 435, 6) MEL-B + IM 20, 7) MEL-B + Lipase aus *M. miehei* und 8) MEL-B + Novo 388. 72 h Reaktionszeit. Reaktionstemperatur 70 °C, LSM:Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:10:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure, **rot-umrandet** = neue Produkte (in Zusammenarbeit (Beyrle 2011))

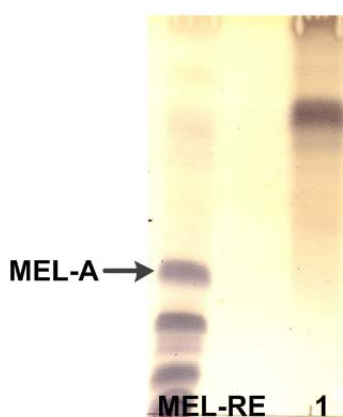
Aus diesen Beobachtungen heraus wurde jeweils ein präparativer Reaktionsansatz (nach Schema des Standardansatzes Abschnitt 2.12.2.1) für die Acylierung von MEL-A und MEL-B mit 3-OH-Decansäure und den ermittelten optimalen Lipasen gestartet (Abb. 3.25). Nach 24 h (Spur 1 und 3) und 48 h (Spur 2 und 4) wurde eine Probe genommen und eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Zunahme des Hauptproduktes von 24 h auf 48 h nur geringfügig ändert und dass kein kompletter Substratumsatz stattfand. Allerdings ließen sich minimale Nebenprodukte beobachten. Eine längere Reaktionsdauer bewirkte keine weitere Änderung des Umsatzes.



**Abb. 3.25:** NP-DC der präparativen Ansätze der enzymatischen Acylierung von MEL-A und MEL-B mit 3-OH-Decansäure. Spuren 1 und 2: MEL-A + Novozym 435, 24 h, 48 h. Spuren 3 und 4: MEL-B + Lipase aus *Mucor miehei*, 24 h, 48 h. MEL-RE - MEL-Rohextrakt. Reaktionstemperatur 70 °C, LSM:Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:10:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure, **rot-umrandet** = neue Produkte (in Zusammenarbeit Beyrle, 2011)

Die folgende Strukturaufklärung wurde für die beiden Hauptprodukte aus den zwei unterschiedlichen Reaktionen durchgeführt (Abschnitt 3.2.3).

Ein ähnliches Verhalten konnte bei den Vortests hinsichtlich der Acylierung mit der 17-OH-Stearinsäure beobachtet werden (ohne Abbildung). Die Reaktion wurde ebenfalls mit MEL-A und MEL-B durchgeführt und die genutzten Lipasen waren die gleichen, wie bei der Reaktion mit 3-OH-Decansäure. Die ermittelte optimale Temperatur war hier 60 °C. Ein neues Produkt konnte für den Ansatz mit MEL-A sichtbar gemacht werden, aber für den Ansatz mit MEL-B konnte auch nach wiederholten Versuchen keine Reaktion beobachtet werden. Das neue Glykokonjugat (siehe Abb. 3.26) aus der MEL-A-Reaktion mit 17-OH-Stearinsäure wurde anschließend mittels Strukturaufklärung bestimmt.



**Abb. 3.26:** NP-DC des aufgereinigten präparativen Ansatzes der Lipase-katalysierten Acylierung 1) Produkt aus MEL-A + Novozym 435 + 17-OH-C18 bei 60 °C nach 48 h. LSM:Toluol. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:10:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure (in Zusammenarbeit Beyrle, 2011)

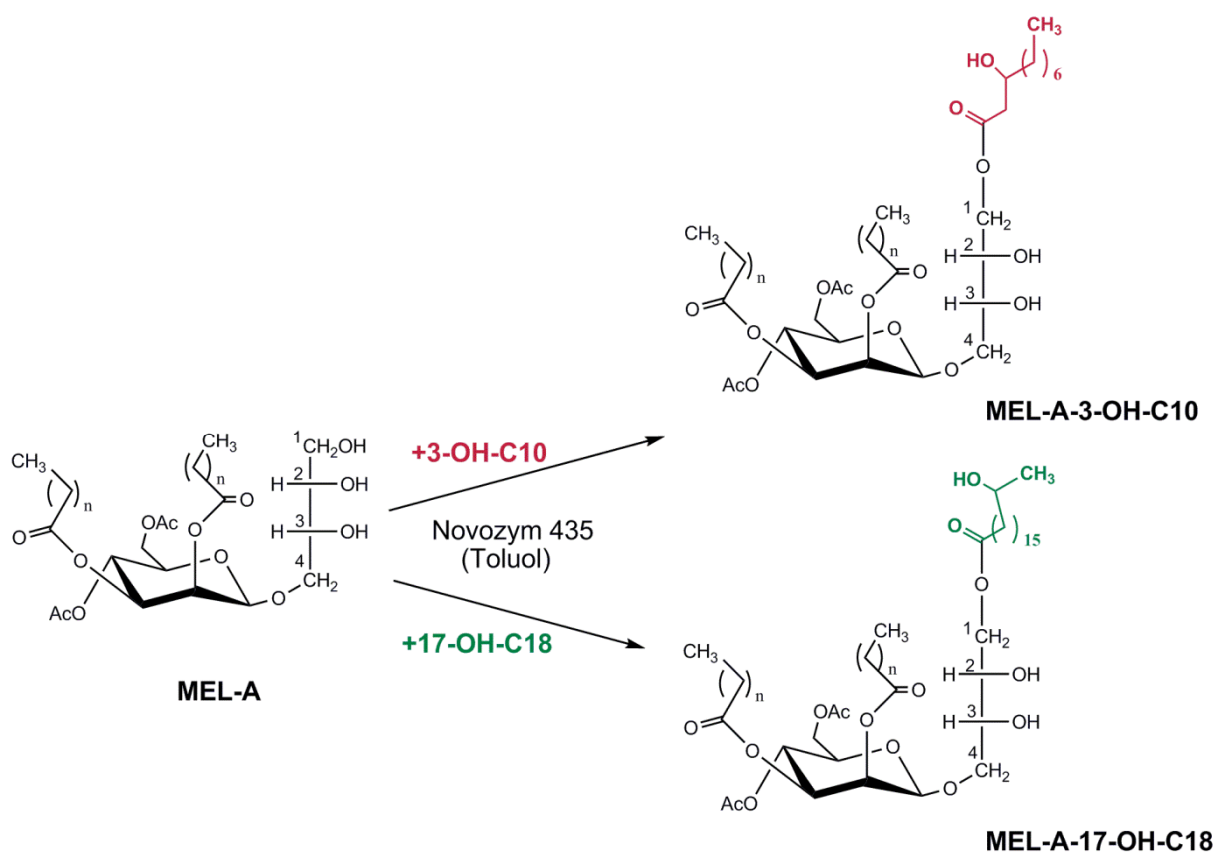
### 3.2.3 Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und  $(^1\text{H}, ^1\text{H})$ - und  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -COSY-Spektren sowie die Massenspektren (Positiv-Ionen ESI-MS) wurden für die Strukturaufklärung herangezogen. Alle aus der enzymatischen Modifikation resultierenden neuartigen Glykokonjugate und ihre Ausgangssubstanzen wurden auf diese Weise analysiert.

#### 3.2.3.1 Strukturen der neuen Glykokonjugate aus den Lipase-katalysierten Acylierungen

Die drei neuen Glykokonjugate aus der Acylierung mit 3-Hydroxy-Decansäure und 17-Hydroxy-Stearinsäure wurden isoliert und mittels NMR/MS analysiert.

MEL-A wurde mit beiden ungewöhnlichen Fettsäuren in der einzig vorliegenden primären Hydroxy-Position, dem C-1 des Erythritols, acyliert (Abb. 3.27). Nachgewiesen werden konnte dies u.a. durch die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, deren Daten in Tabelle 3.17 zusammengefasst sind. Im Vergleich zum Substrat MEL-A zeigen die 1A und 1B-Protonen der neuartigen Glycolipide, MEL-A-3-OH-C10 und MEL-A-17-OH-C18, signifikante Tieffeld-Verschiebungen von ursprünglich 3.64/3.72 ppm hin zu 4.29/4.17 ppm bzw. 4.25-4.29/4.14-4.16 ppm, die für Acylierungen von freien Hydroxygruppen charakteristisch sind. Bei MEL-A-3-OH-C10 sind aufgrund der OH-Funktion in der zusätzlichen Fettsäurekette markante Multipllett-Signale bei 4.01, 2.52 und 1.50 ppm zu erkennen. Im Falle von MEL-A-17-OH-C18 sind diesbezüglich die Multipletts bei 3.72-3.75 und 1.62 ppm sowie das auffällige Dublett bei 1.15 ppm für die endständige  $\text{CH}_3$ -Gruppe zu erwähnen. Die hier nicht gezeigten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (siehe Anhang, Tabelle VI. 3) bestätigen, u.a. durch das Auftreten eines fünften Signals im Bereich von über 170 ppm, das zusätzliche Carboxyl-C-Atom der fünften Acetyl/Acyl-Gruppe in den Molekülen.

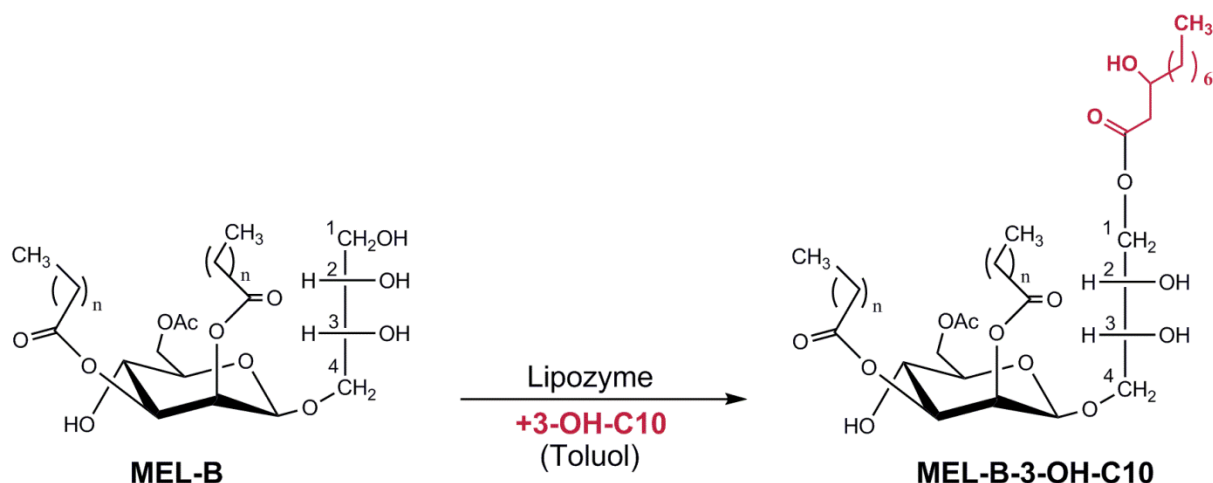


**Abb. 3.27:** Enzymatische Modifikation von MEL-A mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit 3-Hydroxy-Decansäure bzw. 17-Hydroxy-Stearinsäure. Neue Produkte: MEL-A-3-OH-C10 und MEL-A-17-OH-C18 ( $n = 6-12$ ,  $n = 7$  dominant)

**Tabelle 3.17:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von MEL-A, MEL-A-3-OH-C10 und MEL-A-17-OH-C18 (aufgenommen in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 7:3$ ); s: Singulett, bs: breites Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		MEL-A	MEL-A-3-OH-C10	MEL-A-17-OH-C18
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)
D-Mannose	C-1'	4.82 bs	4.81 s	4.80 s
	C-2'	5.51 d / 3.5	5.50 d / 3.1	5.50 d / 3.2
	C-3'	5.09 dd / 3.3/10.1	5.09 dd / 3.3/10.1	5.08 dd / 3.3/10.1
	C-4'	5.26 t / 10.0	5.25 t / 10.0	5.25 t / 10.0
	C-5'	3.76 m	3.74 m	3.72 – 3.75 m
	C-6'A	4.29 dd / 5.4/12.3	4.29 m	4.25 – 4.29 m
	C-6'B	4.16 dd / 2.5/12.3	4.17 dd / 2.5/12.4	4.14 – 4.16 m
	$\text{CH}_3\text{-COO-(C-4')}$	2.05 s	2.05 s	2.04 s
	$\text{CH}_3\text{-COO-(C-6')}$	2.11 s	2.10 s	2.10 s
meso-	<b>C-1A</b>	<b>3.72 m</b>	<b>4.29 m</b>	<b>4.25 – 4.29 m</b>
Erythritol	<b>C-1B</b>	<b>3.64 m</b>	<b>4.17 m</b>	<b>4.14 – 4.16 m</b>
	C-2	3.56 m	3.74 m	3.68 – 3.77 m
	C-3	3.63 – 3.72 m	3.68 – 3.77 m	3.68 – 3.77 m
	C-4A	4.05 m	3.68 – 3.77 m	3.68 – 3.77 m
	C-4B	3.71 m	4.05 m	4.03 dd / 2.9/10.8
Acylreste	-C=O (C-2')	-	-	-
	(C-3')	-	-	-
	(C-1)	-	-	-
	-CO- <u>CH<sub>2</sub></u> - (C-2')	2.44 m	2.44 m	2.44 m
	(C-3')	2.23 t / 7.5	2.23 m	2.23 t / 7.5
	(C-1)	-	-	2.34 t / 7.6
	-CO-CH <sub>2</sub> - <u>CH<sub>2</sub></u> -	1.53 – 1.67 m	1.60 m	1.50 – 1.70 m
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1.26 – 1.37 m	1.26 – 1.37 m	1.26 – 1.33 m
	-CH <sub>3</sub>	0.88 t / 7.0 (x2)	0.88 t / 6.9 (x3)	0.86 – 0.89 m
	<b>-CO-<u>CH<sub>2</sub></u>-CHOH-</b>	-	<b>2.52 m</b>	-
	<b>-CO-CH<sub>2</sub>-<u>CHOH</u>-CH<sub>2</sub>-</b>	-	<b>4.01 m</b>	-
	<b>-CHOH-<u>CH<sub>2</sub></u>-CH<sub>2</sub>-</b>	-	<b>1.50 m</b>	-
	<b>-<u>CH<sub>2</sub></u>-CHOH-CH<sub>3</sub></b>	-	-	<b>1.62 m</b>
	<b>-CH<sub>2</sub>-<u>CHOH</u>-CH<sub>3</sub></b>	-	-	<b>3.72 – 3.75 m</b>
	<b>-CHOH-<u>CH<sub>3</sub></u></b>	-	-	<b>1.15 d / 6.2</b>

MEL-B konnte, wie zuvor erwähnt, nur mit der 3-OH-Decansäure in C-1 des Erythritols substituiert werden (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** Enzymatische Modifikation von MEL-B mittels Lipase-katalysierter Acylierung mit 3-Hydroxy-Decansäure. Neues Produkt: MEL-B-3-OH-C10 ( $n = 6-12$ ,  $n = 7$  dominant)

In dieser Ausgangsverbindung fehlt, verglichen mit MEL-A, die Acetylgruppe in C-4'-Position der Mannose. Was MEL-B-3-OH-C10 betrifft, so kann man auch hier die oben genannte Tieffeld-Verschiebung für die 1A- und 1B-Protonen (Erythritol) hin zu 4.22 bzw. 4.16 ppm beobachten, was für die Einführung einer Carboxyl-Gruppe anstelle einer Hydroxy-Gruppe spricht. Außerdem sind die Multipletts bei 4.00-4.03, 2.52 und 1.44 ppm für die Protonen in unmittelbarer Nachbarschaft zur 3-OH-Funktion der ungewöhnlichen Fettsäure zu erkennen. Zusätzlich spricht das gegenüber MEL-B verstärkte Signal (Triplett) bei 0.88 ppm für eine weitere endständige Methylgruppe. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ist ein viertes Signal im Bereich über 170 ppm hinzugekommen, was für eine weitere Carboxyl-Gruppe im Molekül (bei MEL-B drei dieser Gruppen) spricht; siehe Anhang (Tabelle VI. 3).



**Tabelle 3.18:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von MEL-B und MEL-B-3-OH-C10 (aufgenommen in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 7:3$ ); s: Singulett, bs: breites Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		MEL-B	MEL-B-3-OH-C10
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)
D-Mannose	C-1'	4.76 bs	4.76 s
	C-2'	5.47 d / 3.3	5.47 d / 3.3
	C-3'	4.91 dd / 3.4/9.8	4.90 dd / 3.4/9.9
	C-4'	3.64 – 3.75 m	3.66 – 3.76 m
	C-5'	3.57 m	3.59 m
	C-6'A	4.45 dd / 2.1/12.0	4.46 dd / 2.1/12.0
	C-6'B	4.36 dd / 2.6/6.0	4.31 m
	CH <sub>3</sub> -COO-(C-4')	-	-
	CH <sub>3</sub> -COO-(C-6')	2.11 s	2.11 s
meso-	C-1A	3.64 – 3.75 m	4.22 m
Erythritol	C-1B	3.64 – 3.75 m	4.16 m
	C-2	3.64 – 3.75 m	3.66 – 3.76 m
	C-3	3.64 – 3.75 m	3.66 – 3.76 m
	C-4A	3.64 – 3.75 m	3.66 – 3.76 m
	C-4B	4.01 dd / 2.9/10.6	4.01 dd / 3.0/11.0
Acylreste	-C=O (C-2')	-	-
	(C-3')	-	-
	(C-1)	-	-
	-CO-CH <sub>2</sub> - (C-2')	2.40 t / 7.5	2.41 t / 7.5
	(C-3')	2.29 t / 7.5	2.29 m
	(C-1)	-	-
	-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1.58 – 1.66 m	1.64 m
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1.26 – 1.37 m	1.26 – 1.36 m
	-CH <sub>3</sub>	0.88 t / 6.6 (x2)	0.88 t / 7.0
	-CO-CH <sub>2</sub> -CHOH-	-	2.52 m
	-CO-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -	-	4.00 – 4.03 m
	-CHOH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	-	1.44 m

**Massenspektrometrische Daten aller MEL-A- bzw. MEL-B-Abkömmlinge**

Die erhaltenen NMR-Daten wurden anschließend noch durch die Messung der Massenspektren der neuen Substanzen abgesichert (Tabelle 3.19).

**Tabelle 3.19: MS-Daten von MEL-A und MEL-B und allen neuen Glycokonjugaten**

Komponente	$[M + Na]^+$ gefunden	$[M + Na]^+$ kalkuliert	Summenformel
MEL-A	671,3608*	671,3613	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>
MEL-B	629,3503*	629,3508	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>12</sub>
MEL-A-3-OH-C10	841,4914*	841,4925	C <sub>42</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>
MEL-A-17-OH-C18	953,6167*	953,6172	C <sub>50</sub> H <sub>90</sub> O <sub>15</sub>
MEL-B-3-OH-C10	799,4811*	799,4815	C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>

\* n = 7 (dominant)

**Quantitative Daten zu den Biokatalyse-Versuchen**

Mit den ermittelten molekularen Massen der neuen Glycokonjugate wurde die Produktausbeute bezogen auf die jeweilige Ausgangssubstanz MEL-A (150 mg) oder MEL-B (150 mg) berechnet. Die praktische Ausbeute wurde anschließend mit der theoretischen ins Verhältnis gesetzt (Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.20: Quantitative Daten aus den enzymatischen Acylierungen an MEL-A bzw. MEL-B**

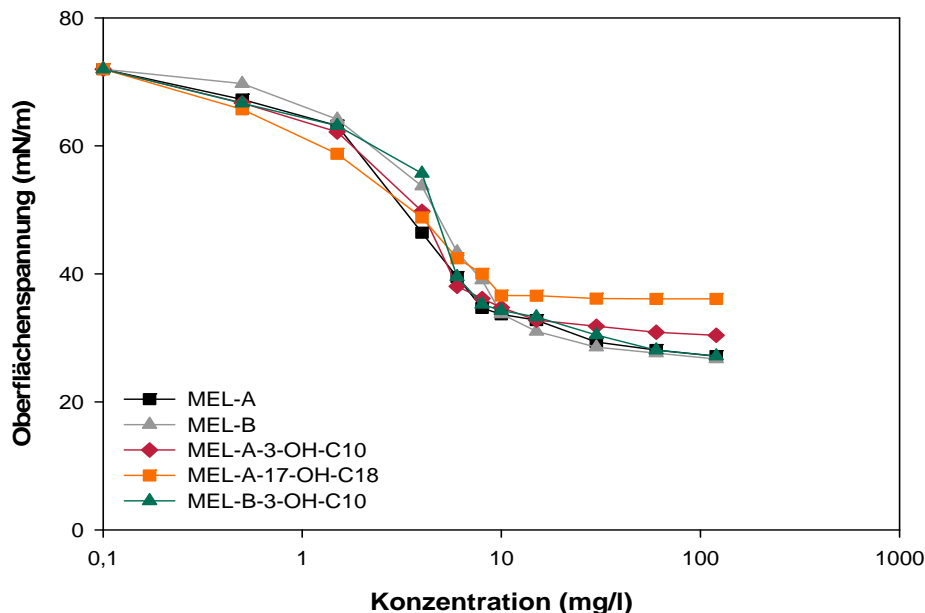
Substrate (eingesetzte Mengen in mg)	Glycokonjugat	Menge (mg)	Ausbeute (%)
MEL-A (150) + 3-OH-Decansäure (150)	MEL-A-3-OH-C10	22	12
MEL-A (150) + 17-OH-Stearinsäure (150)	MEL-A-17-OH-C18	43,5	20
MEL-B (150) + 3-OH-Decansäure (150)	MEL-B-3-OH-C10	31,25	17

### 3.2.4 Physicochemische Charakterisierung der modifizierten Glycolipide

Da die Glycolipide MEL-A und MEL-B, die als Ausgangssubstanzen für die Modifikationen dienten, gute Ober- und Grenzflächeneigenschaften aufweisen (Kitamoto et al. 1993), wurden die neuartigen Glycolipide nach der Isolierung und Aufarbeitung ebenfalls auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser

Hinsichtlich der neuen Glycolipide MEL-A-3-OH-C10, MEL-A-17-OH-C18 und MEL-B-3-OH-C10 sowie der Substrate MEL-A und MEL-B ist der Einfluss auf die Oberflächenspannung von Wasser in Abb. 3.29 abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die oberflächenaktivsten Substanzen die Ausgangssubstrate MEL-A und MEL-B und das Produkt MEL-B-3-OH-C10 waren. MEL-A-3-OH-C10 und MEL-A-17-OH-C18 zeigten nicht ganz so gute Eigenschaften, was durch die hinzugefügten hydrophoben Anteile bedingt sein könnte. Der Einfluss von MEL-B auf die Oberflächenspannung war vergleichbar mit dem Einfluss von MEL-B-3-OH-C10, da die minimalen Oberflächenspannungen bei 27 mN/m lagen.



**Abb. 3.29:** Einfluss der Ausgangssubstanzen MEL-A und MEL-B und der neuartigen Glycolipide MEL-A-3-OH-C10, MEL-A-17-OH-C18 und MEL-B-3-OH-C10 aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Stearinsäure auf die Oberflächenspannung von Wasser bei 25 °C

Sowohl die minimal gemessenen Oberflächenspannungswerte als auch die kritischen Mizellbildungskonzentrationen sind in Tabelle 3.21 zusammengefasst.

**Tabelle 3.21:** Daten zum Einfluss der Substrate MEL-A und MEL-B bzw. deren Abkömmlinge auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Oberflächenspannung	Kritische Mizellbildungs-
	$\sigma$ (mN/m)	konzentration cmc (mg/l)
<b>MEL-A</b>	27	120
MEL-A-3-OH-C10	30	120
MEL-A-17-OH-C18	36	30
<b>MEL-B</b>	27	120
MEL-B-3-OH-C10	27	120

Aus Tabelle 3.21 wird deutlich, dass die beste oberflächenspannungssenkende Wirkung die Ausgangssubstanzen für die enzymatischen Modifikationen, MEL-A und MEL-B, mit jeweils 27 mN/m besitzen. Auch die Substanz, die aus der Modifikation von MEL-B mit der 3-OH-C10 entstand, weist eine reduzierte Oberflächenspannung von Wasser auf. Die kritische Mizellbildungskonzentration lag sowohl bei den Substraten MEL-A und MEL-B als auch bei den neuen Glycokonjugaten bei 120 mg/l. Die einzige Ausnahme bildete das MEL-A-17-OH-C18 aufgrund der Acylierung mit der 17-OH-Stearinsäure. Hier lag der cmc-Wert bei 30 mg/l. Zudem konnte die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf nur 36 mN/m beobachtet werden.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan

Bei diesen Untersuchungen wird deutlich (Abb. 3.30), dass die Ausgangssubstanzen und die Produkte aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit 3-OH-Decansäure ähnliche Werte aufweisen, was durch einen vergleichbaren Kurvenverlauf gekennzeichnet ist.

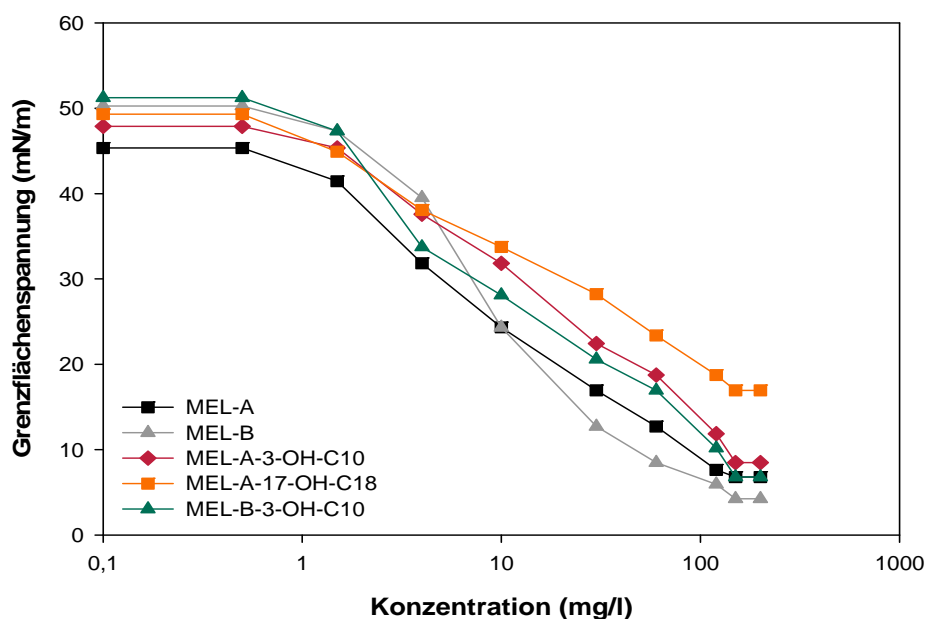


Abb. 3.30: Einfluss der Ausgangssubstanzen MEL-A und MEL-B und der drei neuartigen Glycolipide aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Decansäure auf die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan bei 25 °C

Bei der Betrachtung der genauen Werte für die minimale Grenzflächenspannung (Tabelle 3.22) konnte festgestellt werden, dass MEL-B zur wirkungsvollsten Erniedrigung der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan beiträgt (4 mN/m). MEL-A und MEL-B-3-OH-C10 zeigten, wie auch schon bei der Erniedrigung der Oberflächenspannung, gleiches Verhalten. Dabei erniedrigten diese Substanzen die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan auf 7 mN/m.

Tabelle 3.22: Daten zum Einfluss der Substrate MEL-A und MEL-B bzw. deren Abkömmlinge auf die Erniedrigung der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Grenzflächenspannung $\gamma$ (mN/m)
<b>MEL-A</b>	7
MEL-A-3-OH-C10	9
MEL-A-17-OH-C18	17
<b>MEL-B</b>	4
MEL-B-3-OH-C10	7

Das neue Glycokonjugat MEL-A-17-OH-C18 senkte die Grenzflächenspannung aufgrund seiner langen Fettsäurekette von 50 mN/m auf 17 mN/m und zeigte somit den geringsten

Einfluss auf die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Hexadecan, verglichen mit den anderen vier getesteten Substanzen.

### 3.2.4.3 Bestimmung der Emulsionsstabilität

Die Stabilität der o/w-Emulsionen und der w/o-Emulsionen wurde, wie zuvor für die SL-E<sub>2</sub>-12-Abkömmlinge, auch für MEL-A, MEL-B und die neuen Glycokonjugate über einen Zeitraum von 4 h gemessen. Exemplarisch wird die Wirkung von MEL-B und dem Glycokonjugat MEL-B-3-OH-C10 auf o/w-Emulsionen (Abb. 3.31) und auf w/o-Emulsionen (Abb. 3.32) dargestellt. Bei den o/w-Emulsionstests ist zu erkennen, dass das neue Glycokonjugat mit hier genutzten hydrophoben Phasen (Hexadecan, Kerosin, Mineralöl und Sonnenblumenöl) keinerlei Emulsionen bildet. Hingegen trägt MEL-B sehr gut zur Emulsion von Sonnenblumenöl in Wasser bei. Eine gute stabilisierende Wirkung hat es außerdem auf Kerosin- und Hexadecan-Emulsionen. In w/o-Emulsionen konnte MEL-B wesentlich zur Stabilität der Emulsionen von Wasser in Mineralöl und Sonnenblumenöl beitragen, wobei MEL-B-3-OH-C10 nur eine emulgierende Wirkung in Sonnenblumenöl zeigte (Abb. 3.32).

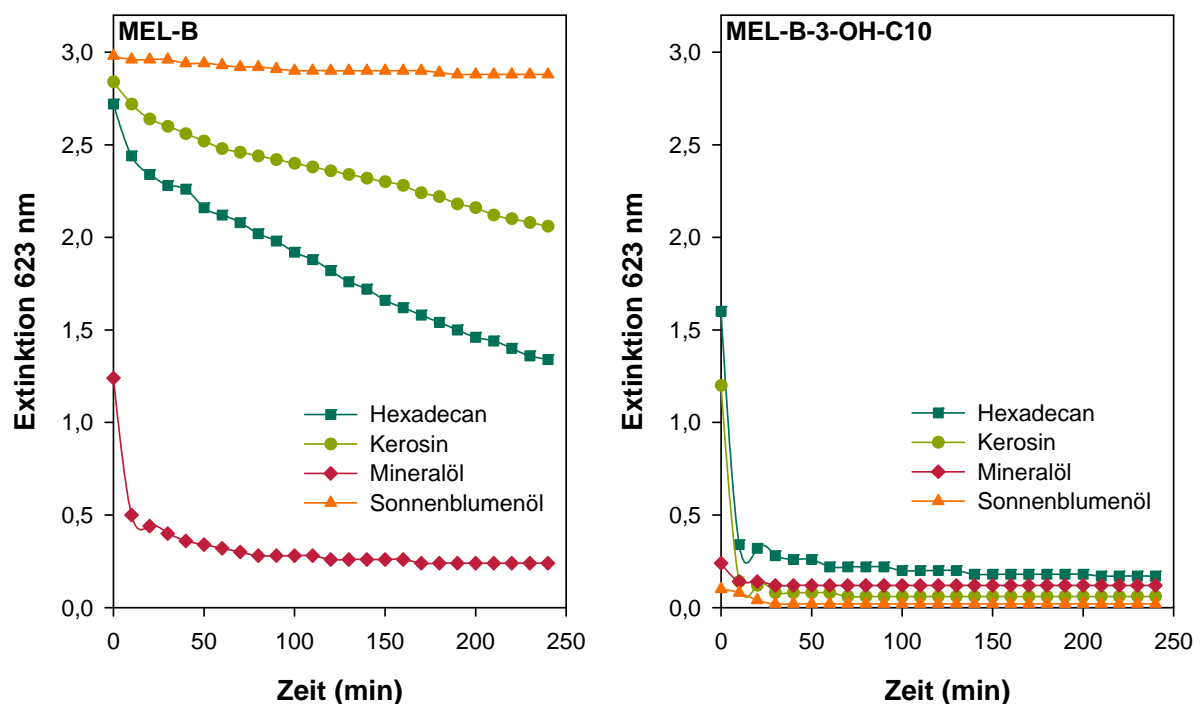


Abb. 3.31: Stabilitäten der o/w-Emulsionen über 4 h mit verschiedenen hydrophoben Phasen, links: Ausgangssubstanz MEL-B (0,125 g/l), rechts: MEL-B-3-OH-C10 (0,125 g/l)

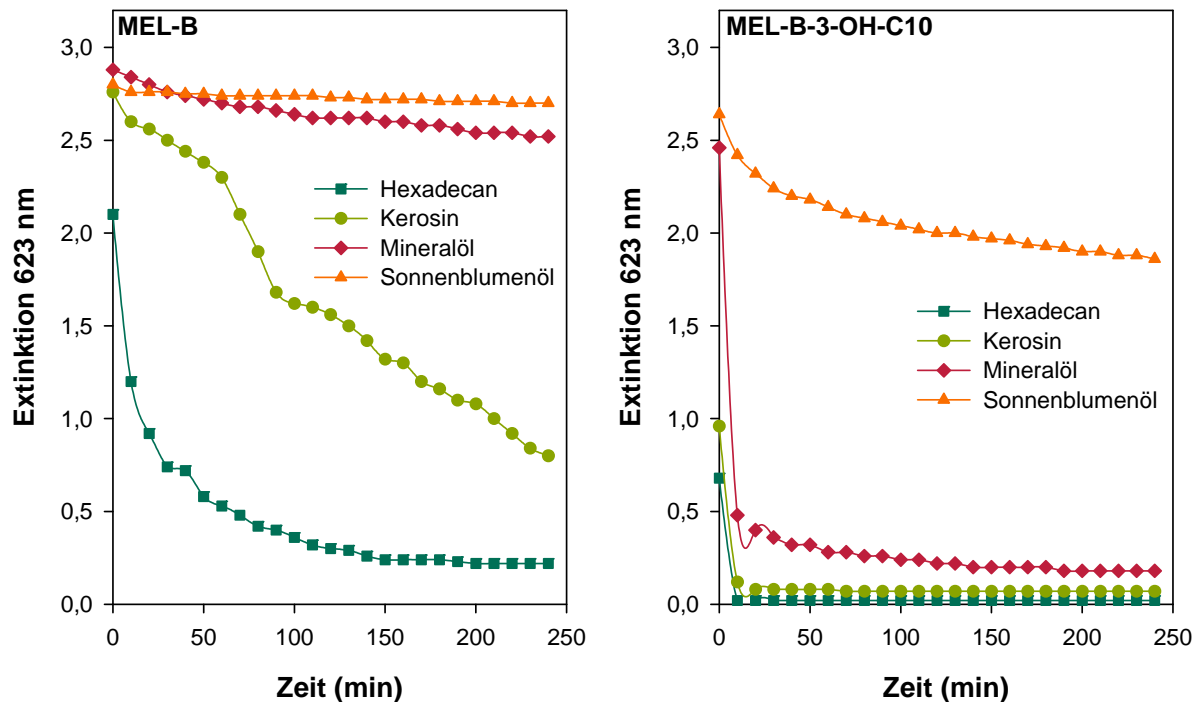


Abb. 3.32: Stabilitäten der w/o-Emulsionen über 4 h mit verschiedenen hydrophoben Phasen, links: Ausgangssubstanz MEL-B (0,125 g/l), rechts: MEL-B-3-OH-C10 (0,125 g/l)

In Tabelle 3.23 sind alle Ergebnisse für die Stabilität von o/w- als auch von w/o-Emulsionen mit den fünf Testsubstanzen zusammengestellt. Aus dieser lässt sich ablesen, dass der Einfluss der getesteten Substanzen in w/o-Emulsionen größer ist und diese daher eine stabilisierende Wirkung ausüben. Die beste emulgierende Wirkung zeigte sich dabei bei Emulsionen von Wasser in Sonnenblumenöl.

Tabelle 3.23: Bewertung der Stabilität von o/w-Emulsionen und w/o-Emulsionen von Wasser/Öl-Gemischen unter Einfluss von Glycolipiden und ungewöhnlichen Fettsäuren.

Hydrophobe Phasen (Öle): Hexadecan, Kerosin, Mineralöl, Sonnenblumenöl.

Messung der optischen Dichte bei 623 nm nach 4 h.  $OD_{623nm} = 2-3 \rightarrow$  sehr gute stabilisierende Wirkung (++),  $OD_{623nm} = 1-2 \rightarrow$  gute Stabilisierung (+),  $OD_{623nm} < 1 \rightarrow$  kaum stabilisierende Wirkung (-)

Testsubstanz	o/w-Emulsionen		w/o-Emulsionen	
	Mineralöl	Sonnenblumenöl	Mineralöl	Sonnenblumenöl
MEL-A	-	-	+	++
MEL-B	-	+	++	++
MEL-A-3-OH-C10	-	-	-	+
MEL-A-17-OH-C18	-	-	-	+
MEL-B-3-OH-C10	-	-	-	+

### 3.2.5 Biologische Aktivitäten der modifizierten Glycolipide

Analog zum Projektteil der Alkyl-Sophoroside (Abschnitt 3.1.5) wurden auch im Falle der Mannosylerythritol-Lipide und ihren Abkömmlingen Agardiffusionstests im eigenen Labor sowie außer Haus Tests zur Anti-Tumor-Wirkung durchgeführt.

#### 3.2.5.1 Agardiffusionstest

Dafür wurden auch hier verschiedene gram-positive (u.a. *B. megaterium*, *B. subtilis*) und gram-negative Bakterien (*E. coli*, *P. aeruginosa*), Pilze (u.a. *U. maydis*), Hefen (*C. magnoliae*) und die Alge *C. fusca* eingesetzt. Tabelle 3.24 fasst die gesamten Ergebnisse für alle Testsubstanzen mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 600 µg zusammen.

**Tabelle 3.24: Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Bakterien, Pilzen und der Alge *C. fusca*.** Substanzmenge der Testsubstanz von 600 µg, (++) Hemmhofdurchmesser > 10 mm, (+) Hemmhofdurchmesser < 10 mm, (-) kein Hemmhof

Testorganismus	Testsubstanzen				
	MEL-A	MEL-B	MEL-A-3-OH-C10	MEL-A-17-OH-C18	MEL-B-3-OH-C10
<b>Bakterien</b>					
<i>Bacillus megaterium</i>	+	++	++	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+	-	+	-
<b>Pilze</b>					
<i>Candida magnoliae</i>	+	+	-	+	+
<i>Eurotium repens</i>	-	-	-	-	-
<i>Mycotypha microspora</i>	-	-	-	-	-
<i>Ustilago maydis</i>	-	-	-	-	-
<b>Alge</b>					
<i>Chlorella fusca</i>	-	-	-	-	-

Die Auswertung des Agardiffusionstests ergab, dass alle Testsubstanzen eine sehr gute bis gute Wirkung auf die beiden gram-positiven Bakterien *B. megaterium* und *B. subtilis* besaßen. Die drei Substanzen MEL-A, MEL-B und das neue Produkt MEL-A-17-OH-C18 zeigten außerdem eine gute Wirkung auf *S. capitis*, welcher ebenfalls gram-positiv ist. Bei der Hefe *C. magnoliae* war eine hemmende Wirkung der Substanzen MEL-A, MEL-B, MEL-A-



17-OH-C10 und MEL-B-3-OH-C10 zu sehen. Hinsichtlich der drei eingesetzten Pilze und der Alge *C. fusca* konnte kein Hemmhof beobachtet werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die besten inhibitorischen Effekte bei den gram-positiven Bakterien *B. megaterium* und *B. subtilis* ermittelt wurden.

### 3.2.5.2 Anti-Tumor-Promoting-Aktivität

Der Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität wurde für alle rein isolierten Produkte MEL-A-3-OH-C10, MEL-A-17-OH-C18 und MEL-B-3-OH-C10 und außerdem noch für die Substrate MEL-A und MEL-B durchgeführt (Tabelle 3.25).

Dieser Test zeigte, dass vor allem die Substrate MEL-A und MEL-B eine starke Inhibierung der Tumoraktivität bewirken und dass zusätzlich zu der Wirkung als Anti-Tumor-Promoting-Reagens eine hohe Überlebensrate (70 %) und damit geringe Zytotoxizität gegenüber den Raji-Zellen auftrat. Die drei neuen Substanzen waren nicht so effizient.

**Tabelle 3.25:** Einfluss verschiedener Substanzen auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)

Substanzen	Konzentration (Molverhältnis/TPA)			
	% Kontrolle (% Überlebensrate)			
	1000	500	100	10
MEL-A	3,6 (70) $\pm$ 0,5	35,3 $\pm$ 1,1	72,8 $\pm$ 1,5	97 $\pm$ 2,3
MEL-B	4,8 (70) $\pm$ 0,5	39,1 $\pm$ 1,3	74,9 $\pm$ 1,7	99 $\pm$ 2,1
MEL-A-3-OH-C10	11,2 (70) $\pm$ 0,6	51,3 $\pm$ 1,5	80,1 $\pm$ 2,0	100 $\pm$ 1,7
MEL-A-17-OH-C18	13,5 (70) $\pm$ 0,6	56,3 $\pm$ 1,4	83,1 $\pm$ 1,8	100 $\pm$ 1,9
MEL-B-3-OH-C10	14,3 (70) $\pm$ 0,7	57,1 $\pm$ 1,5	84,3 $\pm$ 1,8	100 $\pm$ 2,0
HGG*	0 (70) $\pm$ 0,5	20,3 $\pm$ 1,3	38,5 $\pm$ 1,5	72,1 $\pm$ 0,4

\*Heptyl-Galactosyl-Glycerid (Colombo et al. 2002)

### 3.2.5.3 *In vivo*-„two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test

Die Ergebnisse zu diesem Test unter Einsatz der Substrate MEL-A und MEL-B sowie von deren Abkömmlingen sind in Abb. 3.33 zusammengefasst. MEL-A bewirkte nach 20 Wochen eine Reduzierung der Papilloma von 7,9 auf 4,6 ( $\pm$  2,17), die neuen Glycolipide MEL-A-3-OH-C10 auf 5,2 ( $\pm$  0,63) und MEL-A-17-OH-C18 eine auf 5,9 ( $\pm$  0,74). Die Ausgangssubstanz MEL-B zeigte 4,9 ( $\pm$  2,1) Papilloma pro Maus und das neue Glykokonjugat MEL-B-3-OH-C10

noch 5,5 ( $\pm 0,85$ ) Papilloma pro Maus. Die neuartigen Glycolipide schnitten gegenüber den Ausgangssubstanzen MEL-A bzw. MEL-B etwas schlechter ab.

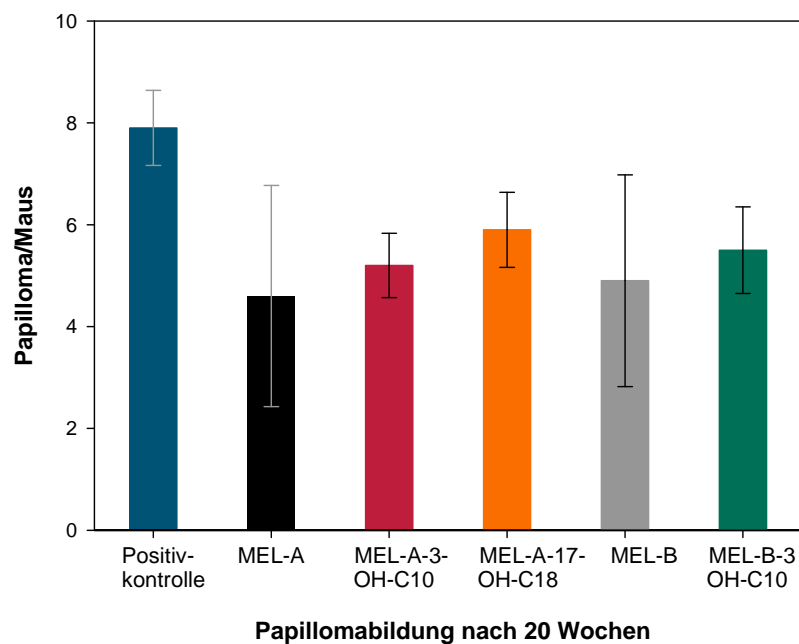


Abb. 3.33: Einfluss der Ausgangssubstanzen MEL-A und MEL-B und der neuen Glycokongugate auf die durchschnittliche Anzahl der Papilloma pro Maus nach 20 Wochen in Bezug auf die **Positivkontrolle** ( $7,9 \pm 0,74$ ) ( $P < 0,005$ )

### 3.2.6 Bilanz zum Abschnitt 3.2

Durch die Lipase-katalysierten Acylierungen der Ausgangssubstanzen MEL-A oder MEL-B mit der ungewöhnlichen 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Decansäure konnten drei neue Produkte gefunden werden, deren Strukturen mittels NMR- und MS-Analyse identifiziert wurden. Dabei war mit MEL-A als Ausgangssubstanz sowohl mit der 3-OH-Decansäure als auch mit der 17-OH-Stearinsäure eine erfolgreiche Acylierung zu beobachten. Hingegen war mit MEL-B nur eine Acylierung mit der kürzeren 3-OH-Decansäure zum neuen Produkt MEL-B-3-OH-C10 gelungen. Die neuen Produkte MEL-B-3-OH-C10 und MEL-A-3-OH-C10 sind ähnlich oberflächenaktiv wie deren Ausgangssubstanzen. Außerdem bewirkten alle neuen Glycokongugate die Wachstumsinhibierung von gram-positiven Bakterien und MEL-A und MEL-B zeigten eine gute inhibierende Wirkung auf die Tumorpromotion.

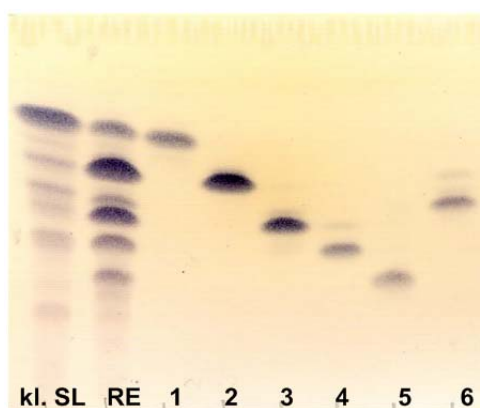
### 3.3 Projektteil: Kultivierung von *C. bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat

Brakemeier et al. (1998b) konnten zeigen, dass neben sekundären Fettalkoholen mit gerader Zahl an C-Atomen (z.B. 2-Dodecanol) auch Ketone dieser C-Kettenlänge als Co-Substrate zur Alkyl-Sophorosid-Bildung durch *C. bombicola* ATCC 22214 geeignet sind. So führte der Einsatz von 2-, 3- und 4-Dodecanon neben Glucose als Haupt-C-Quelle zu Glycolipiden, in denen die C-1'-Position der Sophorose alternativ mit der 2-, 3- bzw. 4-Position des Dodecans glycosidisch verknüpft ist. Erklärbar war dies nur durch eine von der Hefe eingangs ausgeführte enzymatische Reduktion der Ketone zu den entsprechenden sekundären Fettalkoholen, bevor im Anschluss diese an den Zucker gekoppelt wurden.

In den eigenen Studien sollte nun getestet werden, ob auch ein ungeradzahliges Keton, das 2-Tridecanon, ein geeignetes Co-Substrat zur Herstellung von 2-Tridecyl-Sophorosiden ist.

#### 3.3.1 Kultivierung von *C. bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat

Die Kultivierung von *C. bombicola* mit dem Co-Substrat 2-Tridecanon (nach Brakemeier et al. 1998a) ergab nach der DC-Analyse viele Produkte, die mittels MPLC voneinander getrennt und anschließend über NMR-Analyse identifiziert wurden. Zunächst wurden 1,5 g/l Rohprodukt aus den Kultivierungen nach den verschiedenen Extraktionsschritten (Abschnitt 2.8.4) gewonnen. Nach der Auftrennung von 1 g Rohprodukt mittels MPLC wurden sechs verschiedene Komponenten gewonnen (Abb. 3.34; Tabelle 3.26).



**Abb. 3.34:** NP-DC mit Komponenten aus der Kultivierung mit 2-Tridecanon als Co-Substrat, kl. SL: Rohextrakt des klassischen Sophoroselipids (Vergleich), RE: SL-Rohextrakt aus der 2-Tridecanon-Kultivierung, 1-6: Einzelkomponenten nach der Aufreinigung mittels MPLC. 10 µl Probenvolumen; Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (65:15:2); angefärbt mit dem Sprühreagenz  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure

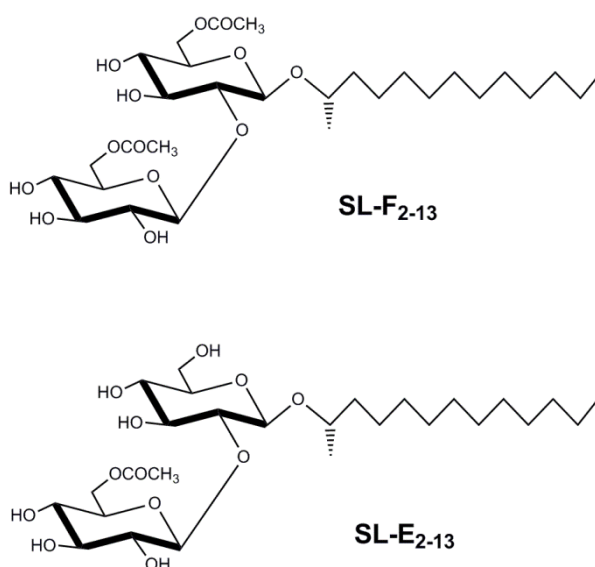
**Tabelle 3.26:** Nach der Aufreinigung (1) Extraktion, 2) MPLC) von 1 g Rohextrakt erhaltene Komponenten mit Gewichtsanteilen

Komponenten	Menge (g)
1	0,05
2	0,125
3	0,2
4	0,04
5	0,15
6	0,02

Ähnliche Versuche mit dem Co-Substrat 2-Undecanon gaben wesentlich schlechtere Ergebnisse, da die Hefekultur kaum anwuchs. Auf eine Isolierung von Metaboliten wurde daher verzichtet.

### 3.3.2 Strukturaufklärung der neuen Glycolipide mittels NMR/MS

Die Spur 1 der Abb. 3.34 deutete im Vergleich zum Rohprodukt des klassischen Sophoroselipids darauf hin, dass hier eine Identität zum wohl bekannten Hauptprodukt (diacetylierte Sophorose; 17-Hydroxy-Octadecan(en)säure, glycosidisch und lactonisch verknüpft mit dem Disaccharid) vorliegen könnte. Auch die  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Untersuchung bestätigte diese Vermutung (siehe Anhang, Tabelle VI. 4). Die dominanten Spuren 2 und 3 der Abb. 3.34 konnten als neuartige Tridecyl-Sophoroside SL-F<sub>2-13</sub> und SL-E<sub>2-13</sub> identifiziert werden (Abb. 3.35).

**Abb. 3.35:** Strukturen von SL-F<sub>2-13</sub> (Spur 2) und SL-E<sub>2-13</sub> (Spur 3)

Ähnlich wie bei den 2-Dodecyl-Sophorosiden in den Arbeiten von Brakemeier et al. (Brakemeier 1997, Brakemeier et al. 1998a) unterscheiden sich beide Glycolipide im

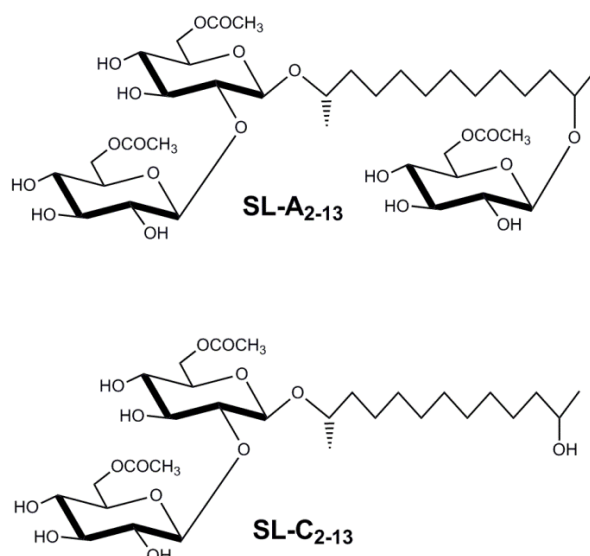
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum a) durch das Fehlen des zweiten Singuletts bei 2.09/2.10 ppm ( $\text{CH}_3$ -Gruppe der Acetylfunktion in C-6'-Position) in SL-E<sub>2-13</sub> sowie b) durch die Hochfeld-Verschiebung der Signale für H-6'A und H-6'B aufgrund der freien OH-Gruppe in C-6' bei SL-E<sub>2-13</sub> (Tabelle 3.27). Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum gibt es bezüglich SL-E<sub>2-13</sub> gegenüber SL-F<sub>2-13</sub> nur jeweils ein Signal für die  $\text{CH}_3$ -Gruppe (20.9 ppm) bzw. die Carboxyl-Gruppe (172.7 ppm). Die ESI-MS-Daten schließlich (Tabelle 3.28) wiesen nach, dass die hier produzierten Glycolipide im Vergleich zu den von Brakemeier et al. (1998b) veröffentlichten eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe mehr im Molekül tragen.

**Tabelle 3.27:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von SL-F<sub>2-13</sub> und SL-E<sub>2-13</sub> (aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		SL-F <sub>2-13</sub>		SL-E <sub>2-13</sub>	
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7	102.6	4.49 d / 7.7	102.4
	C-2'	3.42 dd / 7.8/9.1	83.7	3.42 dd / 7.8/9.3	83.6
	C-3'	3.59 t / 9.1	77.8	3.58 t / 9.1	78.0
	C-4'	3.35 m	71.5 <sup>b</sup>	3.37 m	71.4
	C-5'	3.49 m	74.9	3.29 m	77.6
	C-6'A	4.41 dd / 2.2/11.9	64.8 <sup>c</sup>	3.88 dd / 2.4/11.9	62.7
	C-6'B	4.23 dd / 6.7/11.8	-	3.70 dd / 5.7/11.9	-
	C-1''	4.60 d / 7.8	105.6	4.59 d / 7.8	105.6
	C-2''	3.29 dd / 7.8/9.2	76.1	3.29 m	76.1
	C-3''	3.42 t / 9.2	77.5	3.42 m	77.5
	C-4''	3.35 m	71.4 <sup>b</sup>	3.35m	71.4
	C-5''	3.49 m	75.6	3.49 m	75.6
	C-6''A	4.41 dd / 2.2/11.9	64.9 <sup>c</sup>	4.41 dd / 2.2/11.9	64.9
	C-6''B	4.23 dd / 5.1/11.9	-	4.24 dd / 5.4/11.9	-
	CH <sub>3</sub> COO- (C-6')	2.09 s <sup>a</sup>	20.7 / 172.7	-	-
	CH <sub>3</sub> COO- (C-6'')	2.10 s <sup>a</sup>	20.9 / 172.7	2.10 s	20.9 / 172.7
Alkohol	C-1	1.24 d / 6.2	21.8	1.25 d / 6.2	21.8
	C-2	3.78 m	78.6	3.84 m	78.1
	C-3 A	1.45 m	37.9	1.45 m	37.7
	C-3 B	1.64 m	-	1.67 m	-
	C-4 – C-12	1.33 - 1.41 m	23.7 - 33.1	1.33 - 1.41 m	23.7 - 33.1
	C-13	0.94 t / 6.8	14.4	0.94 t / 6.9	14.4

<sup>a,b,c</sup> austauschbar innerhalb der Spalten

Die DC-Spuren 4 und 6 wurden als SL-A<sub>2-13</sub> und SL-C<sub>2-13</sub> identifiziert (Abb. 3.36).



**Abb. 3.36: Strukturen von SL-A<sub>2-13</sub> (Spur 4) und SL-C<sub>2-13</sub> (Spur 6)**

Bei dem Vergleich von zunächst SL-C<sub>2-13</sub> mit SL-F<sub>2-13</sub> ist an den <sup>1</sup>H-NMR-Daten (Tabelle 3.29) zu erkennen, dass die erstere Verbindung über zwei Acetyl-Gruppen in den Positionen C-6' und C-6'' der Sophorose verfügt (Singulets bei 2.09 bzw. 2.10 ppm). Ein Unterschied fällt hinsichtlich der Fettalkohol-Gruppe auf: Am CH<sub>3</sub>-Ende (Pos. C-13) spricht das Dublett dieser Protonen bei 1.18 ppm für ein dafür verantwortliches Methin-Proton an Position C-12. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum deutet das hinzugekommene Signal bei 68.6 ppm auf die Einführung einer Hydroxygruppe in Position C-12 hin.

Im Falle von SL-A<sub>2-13</sub> fällt bezüglich der NMR-Spektren sofort auf, dass weitere Signale für Glucose-typische Protonen im Bereich 3.34-4.41 ppm bzw. für Glucose-typische C-Atome im Bereich 65.0-104.1 ppm dazugekommen sind. Außerdem sprechen drei Singulets bei 2.09/2.10 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 172.7 ppm (<sup>13</sup>C-NMR) für drei Acetylgruppen im Molekül. Die Tabelle 3.28 mit ihren ESI-MS-Daten bestätigt die neuen Strukturen.

**Tabelle 3.28: ESI-MS-Daten von allen neuen Tridecanon-Produkten**

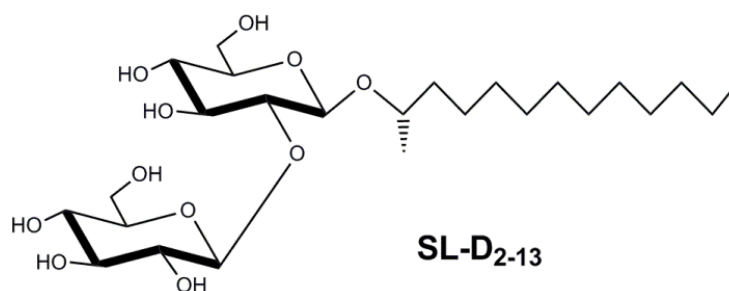
Komponente	[M + Na] <sup>+</sup> <sub>gefunden</sub>	[M + Na] <sup>+</sup> <sub>kalkuliert</sub>	Summenformel
SL-F <sub>2-13</sub>	631,3293	631,3305	C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> O <sub>13</sub>
SL-E <sub>2-13</sub>	589,3188	589,3199	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>12</sub>
SL-C <sub>2-13</sub>	647,3237	647,3249	C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>
SL-A <sub>2-13</sub>	851,3875	851,3883	C <sub>37</sub> H <sub>64</sub> O <sub>20</sub>
SL-D <sub>2-13</sub>	547,3085	547,3089	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>

**Tabelle 3.29:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von SL-C<sub>2-13</sub> und SL-A<sub>2-13</sub> (aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		SL-C <sub>2-13</sub>		SL-A <sub>2-13</sub>	
Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)	$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7	102.6	4.49 d / 7.7	102.7
	C-2'	3.42 dd / 7.9/9.2	83.7	3.30 dd / 7.8/9.3	83.7
	C-3'	3.59 t / 9.1	74.9	3.59 t / 9.1	74.9 <sup>d</sup>
	C-4'	3.34 – 3.36 m	71.5 <sup>b</sup>	3.34 – 3.36 m	71.4 <sup>b</sup>
	C-5'	3.49 m	76.1	3.49 m	76.1 <sup>d</sup>
	C-6'A	4.41 dd / 2.2/11.9	64.8 <sup>c</sup>	4.41 dd / 2.2/11.9	64.8 <sup>c</sup>
	C-6'B	4.22 – 4.25 m	-	4.22 – 4.26 m	-
	C-1''	4.60 d / 7.8	105.6	4.60 d / 7.8	105.6
	C-2''	3.33 m	77.7	3.30 m	77.9 <sup>d</sup>
	C-3''	3.42 m	77.6	3.42 t / 9.3	77.6 <sup>d</sup>
	C-4''	3.34 – 3.36 m	71.4 <sup>b</sup>	3.34 – 3.36 m	71.5 <sup>b</sup>
	C-5''	3.49 m	75.6	3.49 m	75.6 <sup>d</sup>
	C-6''A	4.41 dd / 2.2/11.9	64.9 <sup>c</sup>	4.41 dd / 2.2/11.9	64.9 <sup>c</sup>
	C-6''B	4.22 – 4.25 m	-	4.22 – 4.26 m	-
	C-1'''	-	-	4.37 d / 7.8	104.1
	C-2'''	-	-	3.20 dd / 7.8/9.2	75.1 <sup>d</sup>
	C-3'''	-	-	3.39 t / 9.1	77.9
	C-4'''	-	-	3.34 – 3.36 m	71.8 <sup>b</sup>
	C-5'''	-	-	3.47 – 3.51 m	75.3 <sup>d</sup>
	C-6'''A	-	-	4.41 dd / 2.2/11.9	65.0 <sup>c</sup>
	C-6'''B	-	-	4.22 – 4.26 m	-
	CH <sub>3</sub> COO-(C-6')	2.09 s <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup> / 172.7	2.09 s <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup> / 172.7
	CH <sub>3</sub> COO-(C-6'')	2.10 s <sup>a</sup>	20.9 <sup>a</sup> / 172.7	2.09 s <sup>a</sup>	20.9 <sup>a</sup> / 172.7
	CH <sub>3</sub> COO-(C-6''')	-	-	2.10 s <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup> / 172.7
Alkohol	C-1	1.24 d / 6.2	23.5	1.24 d / 5.8	21.8
	C-2	3.78 m	78.6	3.79 m	78.6
	C-3 A	1.44 m	40.2	1.46 m	37.9
	C-3 B	1.63 m		1.63 m	
	C-4 – C-10	1.5 – 1.3 m	26.3 – 30.9	1.34 – 1.35 m	26.3 – 30.9
	C-11 A	1.42 m	37.9	1.46 m	37.9
	C-11 B	1.49 m		1.63 m	
	C-12	3.75 m	68.6	3.79 m	78.2
	C-13	1.18 d / 6.2	21.8	1.24 d / 5.8	22.0

<sup>a-d</sup> austauschbar innerhalb der Spalten

In Abb. 3.37 ist das Glycolipid SL-D<sub>2-13</sub> dargestellt, das der DC-Spur 5 entspricht.



**Abb. 3.37: Strukturen von SL-D<sub>2-13</sub> (Spur 5)**

Beweise für die vorgeschlagene Molekülstruktur sind die gegenüber SL-F<sub>2-13</sub> sichtbaren Hochfeld-Verschiebungen von H-6'A, H-6'B, H-6''A und H-6''B, das entsprechende Fehlen der Acetylgruppen (<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR; Tabelle 3.30) sowie die ESI-MS-Daten der Tabelle 3.18.

**Tabelle 3.30: <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von SL-D<sub>2-13</sub> (aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD); s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett**

Gruppen		<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz) δ (ppm) / J (Hz)	<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz) δ (ppm)
Sphorose	C-1'	4.49 d / 7.8	102.7
	C-2'	3.49 dd / 7.8/9.1	81.9
	C-3'	3.59 t / 9.0	78.3
	C-4'	3.35 m	71.5 <sup>a</sup>
	C-5'	3.31 m	77.8
	C-6'A	3.88 m	62.7
	C-6'B	3.70 m	-
	C-1''	4.68 d / 7.8	104.6
	C-2''	3.27 dd / 8.1/8.7	75.9
	C-3''	3.41 t / 8.9	78.3
	C-4''	3.33 – 3.37 m	71.8 <sup>a</sup>
	C-5''	3.31 m	77.8
	C-6''A	3.88 m	63.1
	C-6''B	3.70 m	-
Alkohol	C-1	1.29 d / 6.3	21.9
	C-2	3.86 m	78.9
	C-3 A	1.47 m	37.8
	C-3 B	1.64 m	
	C-4 – C-12	1.45-1.31 m	23.7 – 33.1
	C-13	0.94 t / 7.0	14.4

<sup>a</sup> austauschbar innerhalb der Spalte



In Tabelle 3.31 sind die neuen Einzelkomponenten und ihre Substituenten zusammengefasst.

**Tabelle 3.31: Zusammenfassung der durch Strukturaufklärung identifizierten neuen Einzelkomponenten aus der Kultivierung von *C. bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat**

DC-Spur	6'-Position (Sophorose)	6''-Position (Sophorose)	C-12-Position (Fettalkohol)	Bezeichnung
1	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO	- *	SL <sub>18</sub> , klassisch
2	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO	H	SL-F <sub>2-13</sub>
3	H	CH <sub>3</sub> CO	H	SL-E <sub>2-13</sub>
4	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO	Acetylglucose	SL-A <sub>2-13</sub>
5	H	H	H	SL-D <sub>2-13</sub>
6	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO	OH	SL-C <sub>2-13</sub>

\* 17-OH-Octadecan(en)säure in C-1'-Position der Sophorose

### 3.3.3 Physicochemische Charakterisierung der neuen Glycolipide

Der Einfluss der von *C. bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat gebildeten fünf neu identifizierten 2-Tridecyl-Sophoroside, des klassischen SL und dessen SL<sub>2-13</sub>-Rohprodukts auf die Ober- und Grenzflächenspannung wurde untersucht.

#### 3.3.3.1 Bestimmung der Ober- und Grenzflächenspannung

In Tabelle 3.32 sind die Ergebnisse der Ober- und Grenzflächenspannungsmessungen dargestellt. Die stärkste Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser konnte mit dem Rohprodukt der Tridecanon-Kultivierung erreicht werden (30 mN/m), wobei das klassische Sophoroselipid mit 31 mN/m und die beiden Komponenten SL-F<sub>2-13</sub> und SL-E<sub>2-13</sub> mit 32 mN/m eine etwas geringere Erniedrigung hervorriefen. Die Erniedrigung der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Hexadecan war bei SL-F<sub>2-13</sub> und SL-E<sub>2-13</sub> am effektivsten, d.h. die Grenzflächenspannung wurde auf 4 bzw. 3 mN/m herabgesetzt.

**Tabelle 3.32:** Daten zum Einfluss der Substrate MEL-A und MEL-B bzw. deren Abkömmlinge auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser und der Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan, T = 25 °C

Testsubstanz	Minimale Oberflächenspannung $\sigma$ (mN/m)	Kritische Mizellbildungskonzentration cmc (mg/l)	Minimale Grenzflächen <span>­</span> spannung $\gamma$ (mN/m)
SL <sub>18</sub> , klassisch	31	120	13
SL <sub>2-13</sub> <sup>-</sup>	30	120	14
Rohprodukt			
SL-F <sub>2-13</sub>	32	120	4
SL-E <sub>2-13</sub>	32	150	3
SL-C <sub>2-13</sub>	39	120	10
SL-A <sub>2-13</sub>	41	150	13
SL-D <sub>2-13</sub>	41	150	11

#### 3.3.3.2 Bestimmung der Emulsionsstabilität

Die Fähigkeit der neu isolierten Produkte, verschiedene o/w- und w/o-Emulsionen zu stabilisieren, wurde im Folgenden überprüft und die Ergebnisse in Tabelle 3.33 zusammengefasst. Dort lässt sich ablesen, dass der Einfluss dieser Substanzen auf die Stabilität von w/o-Emulsionen viel größer ist als auf die von o/w-Emulsionen. Die beste emulgierende Wirkung zeigte sich bei w/o-Emulsionen mit Sonnenblumenöl. Nur das

Rohprodukt von SL<sub>2-13</sub> zeigte in Kombination mit allen vier hydrophoben Phasen auch eine stabilisierende Wirkung auf o/w-Emulsionen.

**Tabelle 3.33: Bewertung der Stabilität von o/w-Emulsionen und w/o-Emulsionen von Wasser/Öl-Gemischen unter Einfluss von Glycolipiden und ungewöhnlichen Fettsäuren.**

Hydrophobe Phasen (Öle): **Hexadecan**, **Kerosin**, **Mineralöl**, **Sonnenblumenöl**.

Messung der optischen Dichte bei 623 nm nach 4 h. OD<sub>623nm</sub> = 2-3 → sehr gute stabilisierende Wirkung (++), OD<sub>623nm</sub> = 1-2 → gute Stabilisierung (+), OD<sub>623nm</sub> < 1 → kaum stabilisierende Wirkung (-)

Testsubstanz	o/w-Emulsionen				w/o-Emulsionen	
	Hexa-decan	Kerosin	Mineralöl	Sonnenblumen-öl	Mineralöl	Sonnenblumen-öl
SL <sub>18</sub> , klassisch	-	-	-	-	-	++
SL <sub>2-13</sub> -Rohprodukt	+	+	+	++	++	++
SL-F <sub>2-13</sub>	-	-	-	-	++	++
SL-E <sub>2-13</sub>	-	-	-	-	+	++
SL-C <sub>2-13</sub>	-	-	-	-	+	++
SL-A <sub>2-13</sub>	-	-	-	-	+	++
SL-D <sub>2-13</sub>	-	-	-	-	+	++

### 3.3.4 Biologische Aktivität der neuen Glycolipide

Zur Charakterisierung der beschriebenen neuen Glycolipide wurden hier ein Agardiffusionstest und der Anti-Tumor-Promoting-Aktivitäts-Test durchgeführt. Aufgrund des zeitlichen Aspektes wurde auf den 20wöchigen *in vivo*-„two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test verzichtet.

#### 3.3.4.1 Agardiffusionstest

Der Hemmhoftest wurde, wie in Abschnitt 2.15.1 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Mikroorganismen verwendet, wie in den vorangegangenen Abschnitten zu den 2-Dodecyl-Sophorosiden und Mannosylerythritol-Lipiden. Aus Tabelle 3.34 ist zu erkennen, dass die Testsubstanzen auch hier eine inhibierende Wirkung auf die gram-positiven Bakterien *B. megaterium* und *B. subtilis* besitzen. Auf das Hautbakterium *S. capitis* und auf die Hefe *C. magnoliae* konnte ebenfalls eine hemmende Wirkung festgestellt werden. Hingegen beeinflussten die Testsubstanzen das Wachstum von gram-negativen Bakterien, Pilzen und der Alge *C. fusca* nicht.

**Tabelle 3.34: Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Bakterien, Pilzen und der Alge *C. fusca*.** Substanzmenge der Testsubstanz von 600 µg, (++) Hemmhofdurchmesser > 10 mm, (+) Hemmhofdurchmesser < 10 mm, (-) kein Hemmhof

Testorganismus	Testsubstanzen					
	SL <sub>18</sub> , klassisch	SL-F <sub>2-13</sub>	SL-E <sub>2-13</sub>	SL-A <sub>2-13</sub>	SL-D <sub>2-13</sub>	SL-C <sub>2-13</sub>
<b>Bakterien</b>						
<i>Bacillus megaterium</i>	++	+	+	++	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	++	+	++	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+	+	+	-	+
<b>Pilze</b>						
<i>Candida magnoliae</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Eurotium repens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mycotypha microspora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ustilago maydis</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Alge</b>						
<i>Chlorella fusca</i>	-	-	-	-	-	-

### 3.3.4.2 Anti-Tumor-Promoting-Aktivität

Eine weitere Charakterisierung der neuen Produkte erfolgte durch den *in vitro*-Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität. Die erzielten Resultate sind in Tabelle 3.35 aufgelistet. Die Substanz SL-C<sub>2-13</sub>, welche in ihrer Fettsäurekette im Molekül eine zusätzliche OH-Gruppe besitzt, zeigt eine starke Inhibierung der Tumoraktivität. Beim Einsatz einer 1000fach höheren Menge an Testsubstanz als der Tumorpromotor TPA traten nur noch 10,1 % Epstein-Barr-Virus positive Zellen auf. Zudem konnte eine hohe Überlebensrate (70 %) der Raji-Zellen beobachtet werden, was für eine geringe Zytotoxizität der Testsubstanz spricht. Weiterhin konnte ermittelt werden, dass SL-D<sub>2-13</sub> mit zwei OH-Gruppen an C-6' und C-6''-Position einen größeren Einfluss auf die Inhibierung der Tumoraktivität besitzt als die ähnlichen Strukturen SL-E<sub>2-13</sub> (C-6' = OH-Gruppe und C-6'' = Acetylgruppe) und SL-F<sub>2-13</sub> (C-6' = C-6'' = Acetylgruppe).

**Tabelle 3.35: Beurteilung neuartiger 2-Tridecyl-Sophoroside hinsichtlich der Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)**

Substanzen	Konzentration (Molverhältnis/TPA)			
	% Kontrolle (% Überlebensrate)			
	1000	500	100	10
SL-F <sub>2-13</sub>	16,3 (70) ± 0,5	58,6 ± 1,5	86,8 ± 2,2	100 ± 1,3
SL-E <sub>2-13</sub>	14,6 (70) ± 0,6	55,7 ± 1,4	84,8 ± 2,3	100 ± 1,5
SL-A <sub>2-13</sub>	13,2 (70) ± 0,6	54,6 ± 1,7	83,2 ± 2,2	100 ± 1,6
SL-D <sub>2-13</sub>	14,0 (70) ± 0,4	55,9 ± 1,5	84,9 ± 2,0	100 ± 1,6
SL-C <sub>2-13</sub>	10,1 (70) ± 0,5	50,2 ± 1,6	79,3 ± 2,1	100 ± 1,7

### 3.3.5 Bilanz zum Abschnitt 3.3

Die Kultivierung von *C. bombicola* mit dem ungeradzahligem Keton 2-Tridecanon als Co-Substrat war erfolgreich. Durch Aufreinigung mittels MPLC konnten so aus dem Glycolipid-Rohprodukt fünf neuartige 2-Tridecyl-Sophoroside isoliert werden. Diese unterschieden sich in der biochemischen Funktionalisierung der 6'- und 6''-Positionen der Sophorose sowie der 12-Position des Alkylteils. Bei den Ober- und Grenzflächeneigenschaften bzw. den biologischen Aktivitätstests zeigten die Substanzen kleine Unterschiede.

## 4 Diskussion

Seit der Entdeckung der Sophoroselipide (SL) im Jahre 1961 (Gorin et al. 1961) wurden diese durch intensive Untersuchungen studiert und ein möglicher Biosyntheseweg zur Produktion von Sophoroselipiden erstellt (Fleurackers 2006). Bei der Kultivierung der Hefe *C. bombicola* unter Verwendung von Glucose als C-Substrat und Triglycerid als Co-Substrat wurde immer ein extrazelluläres Produktgemisch aus klassischen Sophoroselipiden erhalten (Palme et al. 2010). Das diacetylierte (Position 6' und 6'') Sophoroselipidlacton bildet dabei den größten Anteil. Außerdem befinden sich in dem Gemisch als Vorstufe des Lactons auch nicht-lactonische Sophoroside mit freier Carbonsäurefunktion. Mit dem Co-Substrat 2-Dodecanol gelang es später sogenannte Alkyl-Sophoroside zu produzieren (Brakemeier et al. 1998a). Diese wiesen vergleichbare Oberflächeneigenschaften zu den klassischen Sophoroselipiden auf (Reduktion der Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf ca. 30-33 mN/m).

Da die klassischen Sophoroselipide schon längere Zeit zugänglich sind, ist es nicht überraschend, dass an ihnen Modifikationen durchgeführt worden sind. So wurde z.B. über die chemische Öffnung des Lactonrings und eine anschließende Veresterung der freien Säuregruppe mit primären Alkoholen berichtet (Inoue 1988). Außerdem wurde unter der Nutzung von Enzymen versucht, Strukturveränderungen vorzunehmen, z.B. durch das Enzym Hesperidinase, das das Sophoroselipid zu einem Glucoselipid umwandelte (Rau et al. 1999).

Die ebenfalls hier verwendeten Mannosylerythritol-Lipide (MEL) konnten durch die Kultivierung mit *P. aphidis* produziert werden. Wie auch die Kultivierung der SLs, ist dieses unter Verwendung eines breiten Substratspektrums (Sojaöl oder Sonnenblumenöl) möglich und führt zu einer unterschiedlichen Ausprägung des Produktgemisches (Lipidanteil). Die Hauptprodukte sind dabei MEL-A und MEL-B, welche oberflächenaktiv sind und die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 28,4 mN/m bzw. auf 28,2 mN/m senken (Kitamoto et al. 1993). In der Literatur konnten bereits erste erfolgreiche Modifikationsexperimente beschrieben werden, u.a. die Lipase-katalysierte Hydrolyse von MEL-B zu MEL-D (Fukuoka et al. 2011). Außerdem konnte eine Esterifikation von MEL-A mit Ölsäuremethylester erreicht werden. Dabei konnte die Fettsäure-Einheit direkt am Erythritol-Ende eingebracht und ein tri-acyliertes MEL gebildet werden (Fukuoka et al. 2007).

Die Idee in der vorliegenden Arbeit war nun, besondere Disaccharidstrukturen und ungewöhnliche Lipidanteile mikrobieller Glycolipide mit Hilfe von Enzymen als Biokatalysatoren zu kombinieren. Als Acyl-Akzeptoren wurden das 2-Dodecyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> und die Mannosylerythritol-Lipide MEL-A und MEL-B ausgewählt. Als Acyl-Donoren standen die (*R*)-3-Hydroxy-Decansäure (aus mikrobiellen Rhamnoselipiden) bzw. die (*S*)-17-Hydroxy-Stearinsäure (aus mikrobiellen klassischen Sophoroselipiden) zur Verfügung.

Versuche, nur die Kohlenhydrat-Rückgrate als Acyl-Akzeptoren für die Lipasen-katalysierte Umsetzung mit den ungewöhnlichen Fettsäuren im organischen Lösungsmittel zu benutzen, schlugen aus folgenden Gründen fehl: a) Bezüglich des 2-Dodecyl-Sophorosids war es weder chemisch (saure Bedingungen) noch enzymatisch (Glycosidasen) möglich, die im Handel sehr teure Sophorose herzustellen. b) Mit Blick auf die Mannosylerythritol-Lipide konnten zwar durch alkalische Hydrolyse die Acetyl- und Acylgruppen abgespalten werden; allerdings war die Löslichkeit der Kohlenhydratverbindung im organischen Lösungsmittel zu gering, so dass keine Acylierung bewirkt werden konnte.

Hinsichtlich der zu untersuchenden physicochemischen Eigenschaften der enzymatisch herstellbaren Glycolipide konnte nicht erwartet werden, dass durch das Hinzufügen einer ungewöhnlichen Hydroxy-Fettsäure zu den schon vorhandenen Fettsäure/Fettalkohol-Anteilen z.B. eine stärkere Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser erreicht wird. Dies wird später durch entsprechende Angaben über HLB-Werte (Hydrophilic Lipophilic Balance) belegt.

Bei den Studien zu biologischen Aktivitäten könnte allerdings, wenn eine Tensid-Wirkung nicht als Ursache zugrunde liegt, ein positiver Effekt durch die ungewöhnliche Struktur möglich sein.

Der letzte Versuchsteil beschäftigte sich mit der Kultivierung von *Candida bombicola* auf Glucose (Haupt-C-Substrat) und 2-Tridecanon (Co-Substrat). Zielprodukte waren die *de novo*-Synthese von Alkyl-Sophorosiden mit ungerader Anzahl von C-Atomen in der Fettalkohol-Komponente des Glycolipids. Diese Produkte sind mit Blick auf die Literatur (Brakemeier et al. 1998a, Brakemeier et al. 1998b) ebenfalls neuartig. Auch hier galt es, diese neuen Produkte auf physicochemische bzw. biologische Eigenschaften zu untersuchen.

## **4.1 Projektteil: 2-Dodecyl-Sophoroside**

### **4.1.1 Mikrobielle Nachproduktion der Edukte**

Die Kultivierung von *C. bombicola* zur Nachproduktion der eingesetzten Alkyl-Sophoroside wurde, wie von Brakemeier beschrieben (Brakemeier 1997, Brakemeier et al. 1998b), durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.8). Brakemeier hat diese Kultivierung bereits mit verschiedenen Alkanolen, u.a. mit 2-Decanol, 2-Dodecanol, 2-Tetradecanol und 2-Hexadecanol, im Laufe seiner Dissertation durchgeführt. Für 2-Decanol beobachtete er eine toxische Wirkung auf *C. bombicola* (schlechtes Wachstum); Produkte wurden nur in Spuren nachgewiesen. Mit 2-Hexadecanol ließen sich 14,5 g/l Sophoroselipid bilden; aber auch dieses Substrat wurde unvollständig metabolisiert. Bessere Ergebnisse wurden mit 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol ermittelt: 20 bzw. 18 g/l – Erträge an Alkyl-Sophorosiden. Ein weiterer Versuch galt dem Einsatz von Ketonen, u.a. 2-, 3-, 4-Dodecanon und 2-Hexadecanon, da diese wesentlich preiswerter sind als die Alkanole. Dabei wurden ebenfalls neue Alkyl-Sophoroside erhalten, wobei die Ausbeute etwas geringer war. Da die Ausbeute mit dem Co-Substrat 2-Dodecanol bei Brakemeier am größten war und er viele der Einzelkomponenten (z.B. SL-A<sub>2-12</sub>, SL-B<sub>2-12</sub>, SL-C<sub>2-12</sub>, SL-D<sub>2-12</sub>, SL-E<sub>2-12</sub> und SL-F<sub>2-12</sub>, (Brakemeier et al. 1998a) mittels Strukturaufklärung bestimmen konnte, wurden für die vorliegende Arbeit die Produkte aus der Kultivierung mit 2-Dodecanol ausgewählt.

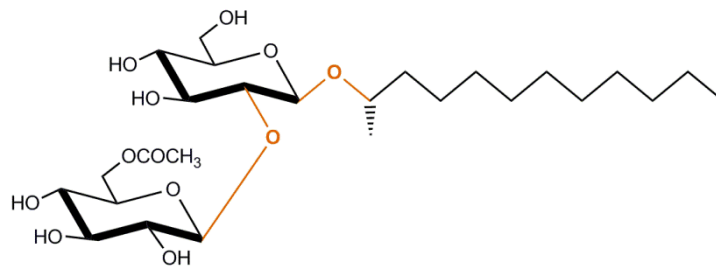
### **4.1.2 Enzymatische Modifikation an 2-Dodecyl-Sophorosiden und 2-Dodecyl-Glucosiden**

Die enzymatischen Modifikationen führten zu neuen Produkten, die anschließend durch Strukturanalyse mittels NMR/MS aufgeklärt wurden.

#### **Glycosidase-katalysierte Hydrolyse des SL-E<sub>2-12</sub>**

Das 2-Dodecyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub>, welches als Ausgangssubstanz für die enzymatischen Modifikationen genutzt wurde, weist zwei glycosidische Bindungen auf, welche durch übliche Glycosidasen eventuell hydrolysierbar sind (Abb. 4.1).





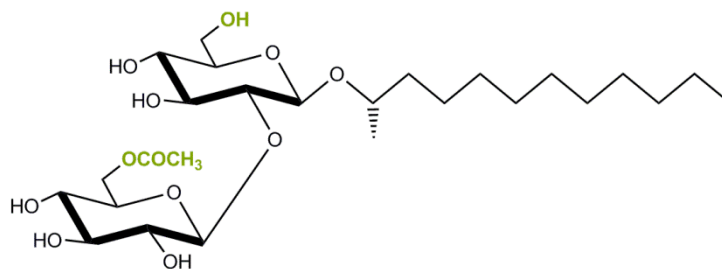
**Abb. 4.1:** Durch übliche Glycosidasen in wässrigen Systemen eventuell hydrolysierbare glycosidische Bindungen (orange) des SL-E<sub>2-12</sub>

Zunächst erfolgten Experimente mit dem Ziel, den 2-Dodecanol-Anteil mit Hilfe verschiedener Glycosidasen abzuspalten, um das Disaccharid Sophorose zu erhalten. Dieses ist im Handel zwar käuflich zu erwerben, aber derzeit zu einem sehr hohen Preis von 271,50 € für 10 mg (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim; Stand: November 2012). Unter Einsatz verschiedener Glycosidasen konnte diese Abspaltung nicht erreicht werden. Mehr Erfolg hatten kürzlich Hoffmann et al., die dies mit aufwendigen chemischen Methoden erreicht haben (Hoffmann et al. 2012).

Unter Verwendung verschiedener Glycosidasen erfolgte statt der Sophorose-Abspaltung, ähnlich wie beim Einsatz eines klassischen Sophoroselipids (Rau et al. 1999), die Abspaltung einer Acetylglucose-Einheit. In diesem Falle konnte die  $\beta$ -Glucuronidase als bestes Enzym für die Reaktion bestimmt werden, da dieses einen guten Substratumsatz bei geringer Enzymmenge zeigte. Durch eine Acetylesterase-Aktivität des  $\beta$ -Glucuronidase-Präparats kommt es außerdem zur Bildung eines Beiproduktes, dass als SL-D<sub>2-12</sub> identifiziert werden konnte. Dieses wurde ebenfalls im Laufe der Reaktion umgesetzt. Das neue Produkt dieser enzymatischen Modifikation wurde durch die Strukturaufklärung als Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> identifiziert. Brakemeier et al. beschrieben das GL-A<sub>2-12</sub> bereits als *de novo*-Produkt bei der Kultivierung mit 2-Dodecanol (Brakemeier et al. 1998a).

### **Lipase-katalysierte Acylierungen von SL-E<sub>2-12</sub> mit gewöhnlichen und ungewöhnlichen Fettsäuren**

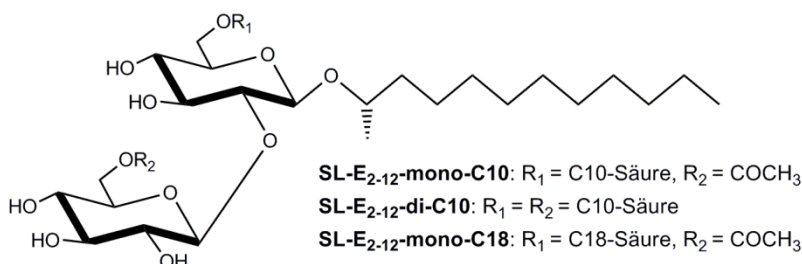
Charakteristisch für die meisten Lipasen ist, dass sie enzymatische Acylierungen nur an primären OH-Gruppen katalysieren (Otto et al. 1998, Otto et al. 2000, Ganske et al. 2003). In Abb. 4.2 sind die durch Lipasen acylierbaren funktionellen Gruppen gekennzeichnet.



**Abb. 4.2:** Durch übliche Lipasen im organischen Lösungsmittel acylierbare funktionelle Gruppen (grün) des SL-E<sub>2-12</sub>

Bevor die kommerziell nicht zugänglichen ungewöhnlichen Fettsäuren als Acyl-Donoren eingesetzt wurden, dienten käufliche Decan- bzw. Stearinsäuren als Lipid-Edukte, um erste Erfahrungen mit der Lipasen-Katalyse zu sammeln. Die Enzyme Novozym 435 und IM 20 erwiesen sich dabei als geeignet. Es war zu beobachten, dass Novozym 435 für eine Monoacylierung und das IM 20 für eine Diacylierung verantwortlich war. Die immobilisierte Lipase Novozym 435 aus *C. antarctica* wurde bereits bei Nuñez et al. für eine Transesterifikation genutzt (Nuñez et al. 2003) und bei Hu und Ju zur enzymatischen Oligomerisation (Hu und Ju 2003). Außerdem konnten Langer et al. eine enzymatische Acylierung des nativen Oligosaccharidlipids GL 3 mit Ölsäure unter der Verwendung von Novozym 435 und dem organischen Lösungsmittel MTBE erreichen (Langer et al. 2006). Aus diesen Gründen wurde Novozym 435 neben zahlreichen anderen Enzymen eingesetzt.

Die Acylierungsreaktionen mit Decansäure brachten zwei neue Glycokonjugate hervor. Zum einen erfolgte eine Monoacylierung an Position 6' und zum anderen eine Diacylierung an Position 6' und 6'' der Sophorose. D.h. dass die Acylierung an den primären OH-Gruppen stattgefunden hat (siehe Abb. 4.2). Die Diacylierung ist dabei nicht nur auf eine Acylierung zurückzuführen, sondern ebenso auf eine Transesterifikation, da die Acetylgruppe des SL-E<sub>2-12</sub> an Position 6'' durch eine Fettsäure ersetzt wurde. Bei der Reaktion mit Stearinsäure konnte jedoch nur eine Monoacylierung an Position 6' nach der Strukturaufklärung zweifelsfrei ermittelt werden (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3:** Struktur der neuen Glycokonjugate aus den enzymatischen Modifikationen mit Decan- bzw. Stearinsäure

Für die Lipasen-katalysierten Acylierungen mit den ungewöhnlichen Fettsäuren (*R*)-3-OH-Decansäure (aus Rhamnoselipiden) und (*S*)-17-OH-Stearinsäure (aus klassischen Sophoroselipiden) wurden die vorherigen Versuche unter Einsatz der gewöhnlichen Fettsäuren und der Lipasen Novozym 435 und IM 20 als Grundlage genutzt. Zum einen wurde eine Diacylierung mit der 3-OH-Decansäure (SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10) und zum anderen ein Produktgemisch aus 40 % Monoacylierung an 6' (SL-E<sub>2-12</sub>-mono-17-OH-C18) und aus 60 % Diacylierung an 6' und 6'' (SL-E<sub>2-12</sub>-di-17-OH-C18) mit der 17-OH-Stearinsäure beobachtet und durch Strukturanalyse nachgewiesen (Abb. 4.4).

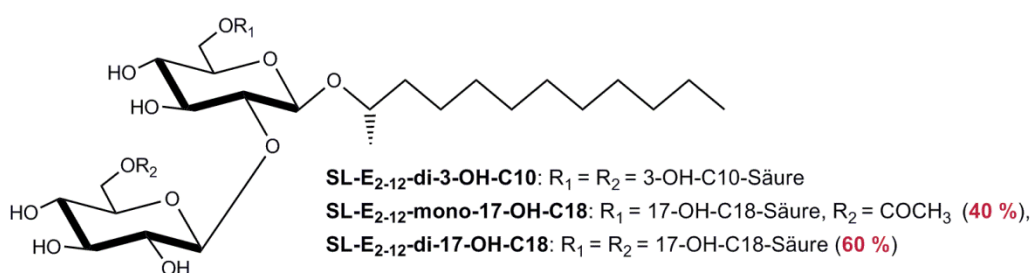


Abb. 4.4: Struktur der neuen Glycokonjugate aus den enzymatischen Modifikationen mit 3-OH-Decansäure bzw. der 17-OH-Stearinsäure

### Lipase-katalysierte Acylierung von GL-A<sub>2-12</sub> mit Sebacinsäure

Das durch die Glycosidase-katalysierte Abspaltung einer Glucose-Einheit aus SL-E<sub>2-12</sub> entstandene neue Glucoselipid GL-A<sub>2-12</sub> wurde zur Acylierung mit Sebacinsäure in Gegenwart der Lipase Novozym 435 eingesetzt. Dabei wurde die einzige primäre OH-Gruppe an Position 6' erfolgreich mit der Sebacinsäure acyliert und somit ein neues Produkt (GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10, Abb. 4.5) gebildet. Die freie Säuregruppe des Sebacinsäurerestes lässt Folgereaktionen zu, so dass z.B. chemische Kopplungsreaktionen bzw. Polyesterbildung möglich sind.

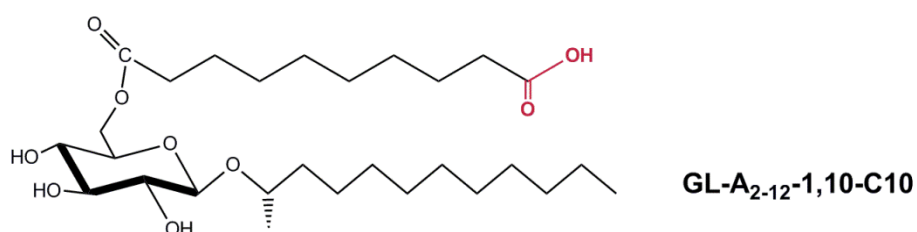


Abb. 4.5: Struktur des neuen Produkts GL-A<sub>2-12</sub>-1,10-C10 aus der Lipase-katalysierten Acylierung mit Sebacinsäure. **Freie COOH-Gruppe**

## 4.2 Projektteil: Mannosylerythritol-Lipide

### 4.2.1 Mikrobielle Nachproduktion der Edukte

Die Kultivierung von *Pseudozyma aphidis* zur Nachproduktion von Mannosylerythritol-Lipiden wurde, wie bei Rau (Rau et al. 2005a, Rau et al. 2005b) beschrieben, durchgeführt. Nach Extraktion des MEL-Rohproduktes und der anschließenden Trennung in die Einzelkomponenten MEL-A und MEL-B via MPLC standen diese damit als Substrat für die enzymatischen Modifikationen zur Verfügung.

### 4.2.2 Modifikation an MEL-A und MEL-B mittels Lipase-Katalyse

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, können die meisten der bekannten Lipasen nur primäre OH-Gruppen und keine sekundären OH-Gruppen funktionalisieren (Otto et al. 1998, Otto et al. 2000, Ganske et al. 2003). Dies gilt ebenso für die Hydrolyse von Fettsäuren durch Lipasen, d.h. es war hier nicht möglich die Fettsäuren an Position 2 und 3 der Mannose mittels Lipase abzuspalten. So konnten auch Fukuoka et al. unter Verwendung der Lipase Novozym 435 im wässrigen Milieu nur zeigen, dass Acetylgruppen in den verschiedenen MELs nur dann hydrolysierbar sind, wenn sie sich in 6'-Position der Mannose befinden (Fukuoka et al. 2011).

Allerdings sollte es möglich sein ein zweites Ziel, die zusätzliche Acylierung bzw. Umesterung an primären OH-Gruppen der Mannose/Erythritol-Komponente, zu erreichen. In Abb. 4.6 sind die durch Lipasen acylierbaren funktionellen Gruppen gekennzeichnet.

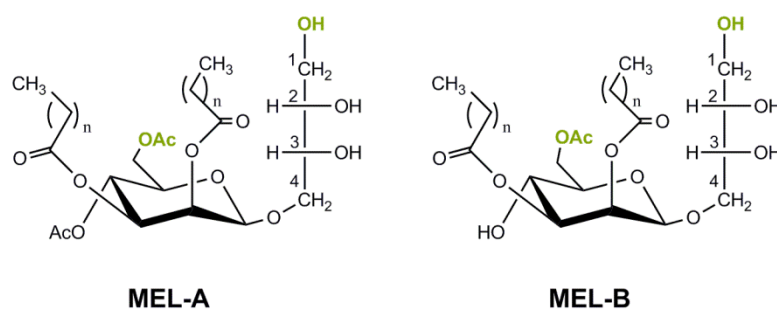
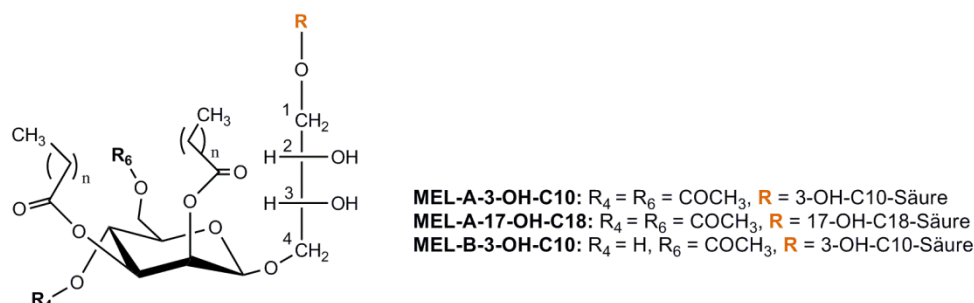


Abb. 4.6: Durch übliche Lipasen im organischen Lösungsmittel acylierbare funktionelle Gruppen (**grün**) von MEL-A und MEL-B ( $n = 6-12$ )

In der Literatur wird dazu schon über ein erfolgreich verlaufenes Experiment berichtet: Mittels der Lipase Novozym 435 in organischem Lösungsmittel ließ sich Ölsäure am Erythritol-Ende anbringen (Fukuoka et al. 2007). Aufgrund dieser positiven Ergebnisse

wurden auch in der vorliegenden Arbeit Acylierungen mit den ungewöhnlichen Fettsäuren 3-OH-Decansäure und 17-OH-Stearinsäure durchgeführt. Aus diesen Reaktionen konnten zwei Produkte mit MEL-A und der jeweiligen Fettsäure und ein Produkt mit MEL-B und der 3-OH-Decansäure erzielt werden (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Struktur der neuen Glycokonjugate aus den enzymatischen Modifikationen mittels Acylierung der 3-OH-Decansäure bzw. 17-OH-Stearinsäure ( $n = 6-12$ ,  $n = 7$  dominant)

Wie bei Fukuoka et al. wurden die Fettsäuren an der primären Hydroxygruppe des Erythritol-Teils durch den Einsatz der jeweiligen Lipase eingeführt (Fukuoka et al. 2007). Ein Austausch der Acetylgruppe an C-6'-Position der Mannose durch die ungewöhnlichen Acyl-Donoren ließ sich nicht beobachten.

### 4.3 Projektteil: Kultivierung von *C. bombicola* mit 2-Tridecanon als Co-Substrat

Die grundlegende Methode zur mikrobiellen Herstellung von Alkyl-Sophorosiden ist seit Ende der 90iger Jahre bekannt (Brakemeier et al. 1998a, Brakemeier et al. 1998b). Geradkettige sekundäre Alkanole, wie z.B. 2-Dodecanol, 2-Tetradecanol oder 2-Hexadecanol, sowie Ketone (z.B. 2-, 3-, 4-Dodecanon) sind dafür sehr gut geeignete Co-Substrate. Der Einsatz der Ketone war vor allem interessant, da diese wesentlich preisgünstiger sind als deren Alkanole. Im eigenen Versuch sollten nun die ungeradzahligen hydrophoben Substrate 2-Undecanon und 2-Tridecanon neben Glucose (Haupt-C-Substrat) für die Kultivierung von *C. bombicola* genutzt werden. Die Verwendung von 2-Undecanon führte zu wenig Wachstum und sehr wenig Produkt. 2-Undecanon ist möglicherweise toxisch für die eingesetzte Hefe *C. bombicola*, was bereits Brakemeier für den Einsatz von 2-Decanol beschrieben hatte (Brakemeier 1997). Aus der Kultivierung mit 2-Tridecanon konnten fünf neue Produkte isoliert werden und mittels NMR/MS war es möglich, die Molekülstrukturen aufzuklären.

Aufgrund der identifizierten neuen Produkte konnte ein vermutlicher Biosyntheseweg (Abb. 4.8) zur Bildung von 2-Tridecyl-Sophorosiden in Anlehnung an Fleurackers Schema für klassische Sophoroselipide erstellt werden (Fleurackers 2006).

Dieser Biosyntheseweg bildet ab, dass das aufgenommene 2-Tridecanon durch die Alkoholdehydrogenase zu 2-Tridecanol umgewandelt wird. Der linke Zweig des Biosynthesewegs zeigt, dass mittels der Glucosyltransferase 1 eine Glucose-Einheit mit 2-Tridecanol glycosidisch verbunden wird. Im nächsten Schritt wird durch die Glucosyltransferase 2 eine weitere Glucose-Einheit eingeführt, so dass SL-D<sub>2-13</sub> entsteht. Im ersten Acetylierungsschritt (Enzym noch unbekannt) erfolgt eine Acetylierung an Position 6'' und SL-E<sub>2-13</sub> wird somit gebildet. Durch einen weiteren Acetylierungsschritt geht schließlich SL-F<sub>2-13</sub> hervor. Der rechte Zweig des Biosynthesewegs zeigt die Hydroxilierung von 2-Tridecanol unter Einfluss einer Monooxygenase zu 2,12-Tridecandiol. Anschließend sorgt die Glucosyltransferase 1 für die Addition einer Glucose-Einheit und die Glucosyltransferase 2 für die Addition einer zweiten Glucose-Einheit. Unter Acetylierung entsteht SL-C<sub>2-13</sub> und durch eine weitere Glucosyltransferase 3 wird eine weitere Glucose-Einheit addiert. Gleichzeitig wird diese acetyliert und somit SL-A<sub>2-13</sub> gebildet.

Bei Brakemeier et al. (Brakemeier et al. 1998a) wurde die optische Aktivität des 2-Dodecanols (nach chemischer Abspaltung) der Alkyl-Sophoroside bestimmt. Der Rotationswinkel betrug dabei +7,4 °, was der S-Konfiguration entspricht. Da es sich dabei um sehr ähnliche Moleküle handelt, wie hier verwendet, kann vermutet werden, dass es sich bei dem 2-Tridecanol ebenso um eine S-Konfiguration handelt; ein entsprechender experimenteller Beweis steht allerdings aus.

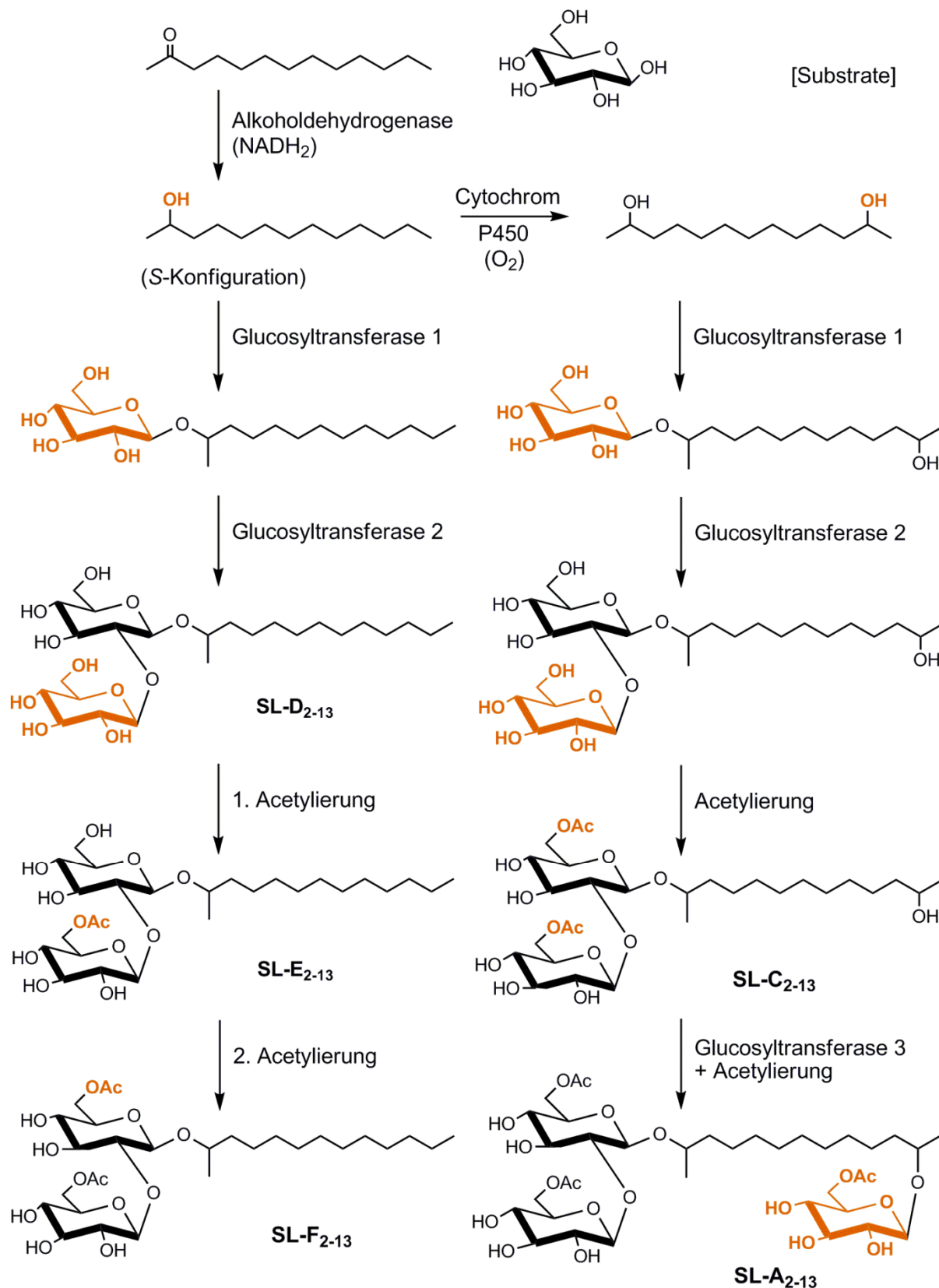


Abb. 4.8: Vermutlicher Biosyntheseweg zur Bildung von 2-Tridecyl-Sophorosiden bei *Candida bombicola* ATCC 22214. C-Quellen: Glucose und 2-Tridecanon (modifiziert nach Fleurackers 2006/Schema für klassische Sophoroselipide)

#### 4.4 Physicochemische Eigenschaften und biologische Aktivitäten der neuartigen Glycolipide

Die neu produzierten Glycolipide zeigten aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung, d.h. dem gleichzeitigen Vorliegens eines hydrophilen Zucker- und eines hydrophoben Lipid-Anteils in einem Molekül, einen amphiphilen Charakter und sollten damit oberflächenaktive Eigenschaften besitzen. Dies wurde hier durch entsprechende Messungen geprüft, wie andererseits auch Tests zu ausgewählten Bioaktivitäten durchgeführt wurden.

##### Physicochemische Eigenschaften aller neuen Glycokonjugate

Die Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der Ausgangssubstanzen bzw. der enzymatischen Reaktionsprodukte auf die Oberflächenspannung von Wasser sowie die Grenzflächenspannung von Wasser/n-Hexadecan-Systemen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Es lässt sich erkennen, dass im Vergleich zu den in der Literatur erwähnten Daten für andere *de novo* vorkommende mikrobielle Glycolipide einige der neuen 2-Dodecyl-Sophorosid- bzw. MEL-A/-B-Abkömmlinge recht gut abschneiden. Wie zu erwarten war, konnten durch die zusätzliche Funktionalisierung mit einer ungewöhnlichen Hydroxy-Fettsäure keine niedrigeren  $\sigma$ - und  $\gamma$ -Werte erreicht werden. Derivate mit der hydrophoben 17-OH-Stearinsäure führten sogar zu drastischer Erhöhung der Oberflächenspannung von Wasser.

Zu beobachten ist, dass das neue Glycokonjugat SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 die Oberflächenspannung von Wasser etwas stärker reduzieren kann als die Ausgangssubstanz SL-E<sub>2-12</sub>, obwohl eine weitere Fettsäurekette ins Molekül eingebracht wurde. Dies ist möglicherweise durch die zusätzliche Hydroxygruppe im Molekül zu erklären, die den hydrophilen Teil des Moleküls somit vergrößert. Eine ähnliche Beobachtung konnte beim Vergleich von MEL-B und dem neuen Glycokonjugat MEL-B-3-OH-C10 gemacht werden.



**Tabelle 4.1: Daten zum Einfluss verschiedener mikrobieller Glycolipide auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser ( $\sigma$ ) und Grenzflächenspannung ( $\gamma$ ) zwischen Wasser/n-Hexadecan**

Glycolipide	$\sigma$ (mN/m)	$\gamma$ (mN/m)	Literatur
<b>de novo-Glycolipide</b>			
Rhamnolipid R 3 (Rha <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> )	31	3	(Syldatk et al. 1985a)
Sophoroselipidlacton SL <sub>18</sub> , klassisch	31	13	eigene Arbeit
Oligosaccharidlipid GL 3	24	7	(Vollbrecht 1999)
Glycosylmannosyl-Glycerolipid GGL.2	33	5	(Wicke et al. 2000)
Diglycosyl-Glycerolipid GGL 11	29	5	(Ramm et al. 2004)
<b>2-Dodecyl-Sophoroside/Glucosid</b>			
SL-E <sub>2-12</sub>	31	3	eigene Arbeit
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	27	5	eigene Arbeit
SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18	50	7	eigene Arbeit
GL-A <sub>2-12</sub>	31	3	eigene Arbeit
<b>Mannosylerythritol-Lipide</b>			
MEL-A	27	7	eigene Arbeit
MEL-B	27	4	eigene Arbeit
MEL-A-3-OH-C10	30	9	eigene Arbeit
MEL-A-17-OH-C18	36	17	eigene Arbeit
MEL-B-3-OH-C10	27	7	eigene Arbeit

Für die neu gebildeten 2-Tridecyl-Sophoroside wurden die gemessenen Oberflächenspannungen mit denen von den 2-Dodecyl- und 2-Tetradecyl-Sophorosiden von Brakemeier (Brakemeier 1997) in Tabelle 4.2 zusammengefasst und verglichen.

**Tabelle 4.2: Vergleich der Oberflächenspannungen [ $\sigma$  (mN/m)] der 2-Dodecyl-, 2-Tridecyl- und 2-Tetradecyl-Sophoroside**

Testsubstanz	SL <sub>2-12</sub> *	SL <sub>2-13</sub>	SL <sub>2-14</sub> *
Rohprodukt	29,8	30	31,4
SL-F	33,3 (31)	32	31
SL-E	33,4 (31)	32	35,6
SL-A	n.d.	41	n.d.
SL-D	38,6	41	42,7
SL-C	n.d.	39	35

\* (Brakemeier 1997), n.d. – nicht durchgeführt; eigene Arbeit

Generell konnte daraus abgeleitet werden, dass die Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser mit der Länge der Fettsäurekette abnimmt. Beispielsweise wurde für SL-D<sub>2-12</sub> eine Erniedrigung auf 39 mN/m erreicht, bei SL-D<sub>2-13</sub> nur noch auf 41 mN/m und ein weiteres C-Atom in der Fettsäurekette (SL-D<sub>2-14</sub>) senkte die Oberflächenspannung nur noch auf 43 mN/m. D.h., die Fettsäurekette hat einen entscheidenden Einfluss auf die Oberflächenaktivität der Substanz. Eine Ausnahme bildeten die Komponenten SL-E<sub>2-12</sub> und SL-F<sub>2-12</sub>, deren Werte etwas höher liegen als die der SL<sub>2-13</sub>-Produkte. Dies ist aber nur für die Messungen von Brakemeier festzuhalten, denn eigene Messungen zeigten für SL-E<sub>2-12</sub> und SL-F<sub>2-12</sub> Werte von 31 mN/m, die wiederum den Einfluss der Fettsäurekette bestätigen. Diese Abweichungen können möglicherweise durch die Messungenauigkeit des verwendeten Tensiometers bedingt sein.

Eine weitere Charakterisierungsmöglichkeit ist das Emulgiervermögen von Biotensiden, welche hier mit der Messung der Emulsionsstabilität der neuen Substanzen in o/w- und w/o-Emulsionen erfolgte (Vollbrecht 1999). Diese Tests können dazu dienen, Anwendungsmöglichkeiten für die Produkte zu finden. Es konnte beobachtet werden, dass die getesteten neuen Glycolipide w/o-Emulsionen wesentlich besser stabilisieren konnten als o/w-Emulsionen.

Anhand des theoretisch berechneten HLB-Werts (Hydrophilic Lipophilic Balance) lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob vorrangig o/w- oder w/o-Emulsionen gebildet werden. Dieser Wert beschreibt zahlenmäßig innerhalb einer vorgegebenen Skala das hydrophile-lipophile Gleichgewicht eines nichtionischen Moleküls und kann wie folgt berechnet werden:

$$HLB = 20 \times \frac{M_H}{M}$$

$M_H$ - Molekulargewicht des hydrophilen Molekülteils	[g/mol]
$M$ - Molekulargewicht des Tensids	[g/mol]

Nach dieser Formel wurden die HLB-Werte für alle neuen Glykokonjugate und deren Ausgangssubstanzen berechnet (Tabelle 4.3).

Nach Heusch (Heusch 1993) werden w/o-Emulsionen vorrangig von Substanzen mit einem HLB-Wert zwischen 3-8 und o/w-Emulsionen bei HLB-Werten zwischen 8-18 stabilisiert. Substanzen die einen HLB-Wert zwischen 7-9 aufweisen, werden als Netzmittel verwendet und Substanzen mit Werten zwischen 11-15 als Waschmittel. Bei einem HLB-Wert um die 10 können o/w-Emulsionen ähnlich gut stabilisiert werden, wie w/o-Emulsionen. Dies konnte

für das Diglucosyl-Glycerolipid GGL 11, welches einen HLB-Wert von 10,1 besitzt, beobachtet werden. Diese Substanz konnte sowohl die o/w-Emulsion als auch die w/o-Emulsion mit Mineralöl sehr gut stabilisieren (Ramm 2001, Ramm et al. 2004). Auch das GL 3 konnte sowohl eine o/w-Emulsion als auch die w/o-Emulsion mit Sonnenblumenöl stabilisieren (Vollbrecht 1999). Die meisten der neuen Glycokonjugate, wie z.B. SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 und MEL-B-3-OH-C10, haben HLB-Werte von 6 bis 11 und konnten im Experiment eher w/o-Emulsionen stabilisieren. Überraschend war, dass die Edukte der enzymatischen Modifikationen, SL-E<sub>2-12</sub>, MEL-A und -B, trotz der relativ hohen HLB-Werte zur Stabilisierung von o/w-Emulsionen ungeeignet waren.

Stabile w/o-Emulsionen sind insbesondere in der Kosmetikindustrie von Interesse, z.B. hinsichtlich der Feuchtigkeitserhaltung der Haut. Wie oben erwähnt werden Substanzen mit HLB-Werten zwischen 7-9 vor allem als Netzmittel verwendet, d.h. als Feuchthaltemittel und zur Imprägnierung. Da einige der neuartigen Glycokonjugate in diesem HLB-Wert-Bereich liegen, wären dies potenzielle Anwendungsmöglichkeiten für diese Substanzen. Weitere Experimente sollten daher zu den Filmdruck-Eigenschaften der neuen Glycokonjugate erfolgen. In der Literatur wurden die nativen Mannoyslerythritol-Lipide bereits als Substanzen mit gutem Feuchtigkeitserhaltungseffekt beschrieben, so dass eine Anwendung in Hautcremes möglich wäre (Kitamoto et al. 2009).

**Tabelle 4.3: HLB-Werte und experimentelle Emulsionsstabilität der neuen Glycokonjugate und zweier bekannter Glycolipide**

Komponente	HLB-Wert	Stabilität von Emulsionen		Anmerkungen
		o/w	w/o	
Oligosaccharidlipid GL 3	12	+	+	(Vollbrecht 1999)
Diglycosyl-Glycerolipid GGL 11	10	+	+	(Ramm et al. 2004)
SL-E <sub>2-12</sub>	14	-	+	eigene Arbeit
GL-A <sub>2-12</sub>	10	-	+	eigene Arbeit
SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	11	-	+	eigene Arbeit
SL-E <sub>2-12</sub> -mono-17-OH-C18	9	-	+	eigene Arbeit
SL-E <sub>2-12</sub> -di-17-OH-C18	6	-	+	eigene Arbeit
MEL-A	13	-	+	eigene Arbeit
MEL-B	12	-	+	eigene Arbeit
MEL-A-3-OH-C10	10	-	+	eigene Arbeit
MEL-A-17-OH-C18	8	-	+	eigene Arbeit
MEL-B-3-OH-C10	9	-	+	eigene Arbeit

### **Biologische Aktivitäten aller neuen Glycokonjugate**

Glycolipide fungieren als Bestandteile der Zellmembran von Bakterien und Pilzen und zudem sind sie im Gewebe von höheren Organismen vorhanden. Einige biologische Aktivitäten wurden bereits für Glycolipide beschrieben; z.B. erhöhen sie die Zellassoziation und die Effizienz von Gentransfektion über Membranfusion (Inoh et al. 2004), inhibieren das Wachstum von humanen promyelozytischen Leukämiezellen HL60 (Kitamoto et al. 2002), haben hohe Bindungsaffinitäten gegenüber Lektinen (Konishi et al. 2007b), wirken auf HIV und die Immobilisierung von Spermien (Shah et al. 2005), agieren als Immunmodulatoren für Parkinson- und Alzheimerkrankheiten (Carr und Bisht 2003), zeigen gute Eigenschaften bei der Behandlung von Sepsis (Bluth et al. 2006) und wirken gegen humane Pankreas-Tumorzellen (Fu et al. 2008).

Zur Charakterisierung der neuen Glycokonjugate wurden folgende drei Tests ausgewählt: der Anti-Tumor-Promoting-Aktivitäts-Test, der *in vivo*-„two-stage mouse skin carcinogenesis“-Test und der Agardiffusionstest.

Gute Anti-Tumor-Promoting-Aktivitäten wurden bereits bei Glycoglycerolipid-analogen Substanzen gefunden (Colombo et al. 2000, Colombo et al. 2002). Für die mikrobiellen Glycosylmannosyl-Glycerolipide GGL.2 und Diglycosyl-Glycerolipide GGL 11 konnten ebenfalls recht gute Wirkungen auf das frühe Antigen des Epstein-Barr-Virus, eine gute Überlebensrate der eingesetzten Raji-Zellen und somit eine gute Verträglichkeit der Substanz beobachtet werden (Ramm et al. 2004, Lurtz 2006). Ein ebenfalls gutes Ergebnis wurde durch Sakurai et al. mit dem Terpen Cimigenol erhalten, was aus der Pflanzengattung *Cimicifuga* stammt (Sakurai et al. 2003, Sakurai et al. 2005).

Ein sehr gutes Ergebnis beim *in vivo*-Test konnten Colombo et al. für ein Heptyl-Galactosyl-Glycerid beobachten, welches eine starke Tumordinhibition und so eine starke Reduzierung der Papilloma zeigte (Colombo et al. 2002). Die neuen Glycokonjugate wurden sowohl im Anti-Tumor-Promoting-Test als auch im *in vivo*-Test eingesetzt. Dabei konnte SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 als wirksamste Substanz bei beiden Tests ermittelt werden und die Ausgangssubstanzen MEL-A und MEL-B konnten eine stärkere chemopreventive Wirkung als die neuen Glycokonjugate zeigen.

Für Sophorose- und Rhamnoselipide wurde in der Literatur bereits eine Hemmung des Wachstums von gram-positiven Bakterien beschrieben (Lang et al. 1989). Auch Kitamoto et al. berichtete von der wachstumshemmenden Wirkung der MELs verstärkt auf gram-

positive Bakterien (Kitamoto et al. 1993). Sowohl die Ausgangssubstanzen SL-E<sub>2-12</sub>, MEL-A und MEL-B als auch die neuen Glycokonjugate (z.B. GL-A<sub>2-12</sub>, SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10, MEL-A-3-OH-C10) zeigten hier ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *B. megaterium* und *B. subtilis*.

Bei den S2-Ersatzorganismen *S. capitis* subsp. *capitis* und *C. magnoliae* konnte für die neuen Glycokonjugate auch eine Wachstumsinhibierung aufgezeigt werden. Da diese beiden Organismen den Stämmen *S. aureus* bzw. *C. albicans* sehr ähnlich sind, lässt sich darauf schließen, dass bei diesen ebenfalls eine wachstumsinhibierende Wirkung zu erwarten ist und die neuen Substanzen möglicherweise eine pharmazeutische Anwendung finden könnten. Dazu wäre es notwendig, die Testsubstanzen für einen Agardiffusionstest mit diesen S2-Organismen einzusetzen, um eine Bestimmung der entstandenen Hemmhöfe durchzuführen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da diese Organismen nur an Institute mit einer gesonderten Genehmigung von der DSMZ ausgehändigt werden. Ein Einfluss auf das Wachstum der Alge *C. fusca* konnte dagegen nicht ermittelt werden, d.h. es können Schäden für die Umwelt weitestgehend ausgeschlossen werden.

Für zukünftige Versuchsreihen könnten mit den erhaltenen neuen Glycokonjugaten weitere biologische Tests mittels pharmazeutischer Assays, wie deren Wirkung auf Proteinkinasen, und auch im umweltbiologischen Bereich deren Wirkung auf Wasserorganismen (Daphinen) durchgeführt werden. Zudem wäre es möglich, die 2-Tridecyl-Sophoroside für die Acylierung mit den ungewöhnlichen Fettsäuren einzusetzen und die entstehenden neuen Produkte zu charakterisieren.

## I Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von *Candida bombicola* bzw. *Pseudozyma aphidis* gezielt Glycolipide nachproduziert und zur enzymatischen Modifikation mit Glycosidasen und Lipasen eingesetzt. Ein wesentliches Ziel war es u.a., bei Lipasen-Katalyse im organischen Lösungsmittel zwei ungewöhnliche Hydroxy-Fettsäuren mikrobiellen Ursprungs, (*R*)-3-OH-Decansäure bzw. (*S*)-17-OH-Stearinsäure, auf native Glycolipide zu übertragen. Das 2-Dodecyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> wurde erfolgreich in den primären C-6'- und C-6''-Positionen der Sophorose acyliert. Im Falle der beiden Mannoyslerythritol-Lipide MEL-A und MEL-B gelang dies in der freien primären OH-Gruppe des Erythritolteils. Insgesamt gingen aus den genannten Lipase-katalysierten Reaktionen und den nachfolgenden NMR/MS-Untersuchungen fünf neuartige Glycokonjugate hervor. Dazu kamen noch vier weitere neuartige Glycolipide, die aus den enzymatischen Acylierungen mit Hilfe von Decan-, Stearin- und Sebacinsäure resultieren; Acyl-Akzeptoren waren 2-Dodecyl-Sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> bzw. 2-Dodecyl-Glucosid GL-A<sub>2-12</sub>.

Neben der Biokatalyse wurde auch die mikrobielle Konversion eines speziellen Co-Substrats, 2-Tridecanon, als effiziente Methode zur Bildung neuartiger Glycolipide durch *C. bombicola* eingesetzt. Nach der NMR/MS-Analyse konnten fünf verschiedene 2-Tridecyl-Sophoroside erfolgreich identifiziert werden.

Die neuartige Glycolipide und ihre Edukte wurden physicochemisch bzw. in Bioaktivitätstests untersucht. Hinsichtlich des Einflusses auf die Senkung der Oberflächenspannung von Wasser waren insbesondere die Kombinationsprodukte aus 2-Dodecyl-Sophorosid bzw. MEL-A/-B und 3-OH-Decansäure effektiv. Fast alle neuen Substanzen stabilisieren w/o-Emulsionen recht gut. Bei den biologischen Tests war auffällig, dass die Glycolipide besonders gram-positive Bakterien inhibieren. Einige Produkte zeigten gute Effekte im *in vivo*-Experiment zur Anti-Tumor-Aktivität.

## II Abstract

In the framework of the present thesis initially unique glycolipids were produced by *Candida bombicola* and *Pseudozyma aphidis* using well-known protocols. Afterwards, after downstream processing, the corresponding pure compounds were functionalized by aid of glycosidases and lipases. An essential aim was the transfer of two uncommon hydroxyl fatty acids of microbial origin, (*R*)-3-OH decanoic acid and (*S*)-17-OH stearic acid, to native glycolipids by lipase catalysis in organic solvent. The 2-dodecyl-sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> was successfully acylated in the primary positions C-6' and C-6'' of the sophorose. In the case of the the mannosylerythriol lipids MEL-A and MEL-B this was performed in the free primary OH group of the erythritol moiety. Altogether five new glycoconjugates were produced by the mentioned lipase-catalyzed reactions. Additionally, four further new glycolipids were gained out of the enzymatic acylations using decanoic acid, stearic acid and sebacic acid. Thereby the acyl acceptors were the 2-dodecyl-sophorosid SL-E<sub>2-12</sub> and the 2-dodecyl-glucosid GL-A<sub>2-12</sub>, respectively.

Besides biocatalysis the microbial conversion of a special co-substrate, 2-tridecanone, was used to get new glycolipids with *C. bombicola*. After NMR/MS analysis five different 2-tridecyl-sophorosides were successfully identified.

The novel glycolipids and their educts were analyzed by physico-chemical and bioactivity tests. Concerning the influence of the new substances to the reduction of the water's surface tension particularly the combined products of 3-OH decanoic acid with 2-dodecyl-sophorosid and MEL-A/B were efficient. Nearly all new substances are able to stabilize w/o emulsions. The biological tests showed that the glycolipids especially inhibited gram positive bacteria. Several products appeared to have good effects in *in vivo* experiment for anti-tumor activity.

### III Literatur

- Adamson, A. W. (1982) Physical chemistry of surfaces. J. Wiley & Sons, New York
- Asmer, H., Lang, S., Wagner, F. und Wray, V. (1988) Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. JAOCS 65: 1460-1466
- Beyrle, C. (2011) Enzymatische Modifikation von Mannosylerythritollipiden. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Bisht, K. S., Grosse, R. A. und Kaplan, D. L. (1999) Enzyme-mediated regioselective acylations of sophorolipids. J Org Chem 64: 780-789
- Bisht, K. S., Gao, W. und Gross, R. A. (2000) Glycolipids from *Candida bombicola*: Polymerization of a 6-O-acryloyl-sophorolipid derivative. Macromol 33: 6208-6210
- Bluth, M. H., Kandil, E., Mueller, C. M., Shah, V., Lin, Y. Y., Zhang, H., Dresner, L., Lempert, L., Nowakowski, M., Gross, R., Schulze, R. und Zenilman, M. E. (2006) Sophorolipids block lethal effects of septic shock in rats in a cecal ligation and puncture model of experimental sepsis. Crit Care Med 34: 188-195
- Boothroyd, B., Thorn, J. A. und Haskins, R. H. (1956) Biochemistry of the ustilaginales XII. Characterization of extrazellulär glycolipids produced by *Ustilago* sp. Can J Biochem Physiol 34: 10-14
- Brakemeier, A., Lang, S., Wullbrandt, D., Merschel, L., Benninghoven, A., Buschmann, N. und Wagner, F. (1995) Novel sophorose lipids from microbial conversion of 2-alkanols. Biotechnol Lett 17: 1183-1188
- Brakemeier, A. (1997) Mikrobielle Alkyl-Glycoside von *Candida bombicola*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Brakemeier, A., Wullbrandt, D. und Lang, S. (1998a) *Candida bombicola*: production of novel alkyl glycosides based on glucose/2-dodecanol. Appl Biochem Biotechnol 50: 161-166
- Brakemeier, A., Wullbrandt, D. und Lang, S. (1998b) Microbial alkyl-sophorosides based on 1-dodecanol or 2-, 3- or 4-dodecanones. Biotechnol Lett 20: 215-218
- Brezesinski, G. und Mögel, H. J. (1993) Grenzflächen und Kolloide. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin (Ger)
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A., Olvera, C., Treviño, L., Déziel, E., Lépine, F. und Soberón-Chávez, G. (2006) Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. Appl Biochem Biotechnol 73: 187-194
- Carr, J. A. und Bisht, K. S. (2003) Enzyme-catalyzed regioselective transesterification of peracylated sophorolipids. Tetrahedron 59: 7713-7724
- Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y. B. und Miao, J. Y. (2006) Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. Appl Microbiol Biotechnol 72: 52-59
- Chong, Y., Lee, K., Chon, C., Kim, M., Kwon, O. und Lee, H. (1997) *Tsukamurella incheonensis* bacteremia in a patient who ingested hydrochloric acid. Clin Infect Dis 24: 1267-1268
- Collins, M., Smida, J., Dorsch, M. und Stackebrandt, E. (1988) *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. Int J Syst Bacteriol 38: 385-391
- Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Kuchide, M., Tokuda, H. und Nishino, H. (2000) Anti-tumor-promoting effects of glyco-glycerolipid analogues on two-stage mouse skin carcinogenesis. Cancer Lett 161: 201-205
- Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Reza-Elahi, S., Scala, A., Toma, L., Aoi, W., Kuchide, M., Takayasu, J., Tokuda, H. und Nishino, H. (2002) Inhibitory effect of



- stabilized analogues of glycolipids on Epstein-Barr virus activation and mouse skin tumor promotion. *Cancer Lett* 186: 37-41
- Colombo, D., Franchini, L., Tomba, L., Ronchetti, F., Nakabe, N., Konoshima, T. und Nishino, H. (2004) Anti-tumor-promoting activity of simple models of galactoglycerolipids with branched and unsaturated acyl chains. *Eur J Med Chem* 40: 69-74
- Colombo, D., Franchini, L., Toma, L., Ronchetti, F., Tanaka, R., Takayasu, J., Nishino, H. und Tokuda, H. (2006) Cyclic and branched acyl chain galactoglycerolipids and their effect on anti-tumor-promoting activity. *Eur J Med Chem* 41: 1456-1463
- Cooper, D. G. und Paddock, D. A. (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl Environ Microbiol* 47: 173-176
- Daniel, H.-J., Reuss, M. und Syltatk, C. (1998) Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnol Lett* 20: 1153-1156
- Daniel, H.-J., Otto, R. T., Binder, M., Reuss, M. und Syltatk, C. (1999) Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 40-45
- Daverey, A. und Pakshirajan, K. (2009) Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Appl Biochem Biotechnol* 158: 663-674
- Dawson, R., Elliott, D., Elliott, W. und Jones, K. (1969) Data for biochemical research. 2: 481-489
- De Lima, C., Ribeiro, E., Sérvulo, E., Resende, M. und Cardoso, V. (2009) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. *Appl Biochem Biotechnol* 152: 156-168
- Deml, G., Anke, T., Oberwinkler, F., Giannetti, B. und Steglich, W. (1980) Schizonellin A and B, new glycolipids from *Schizonella melanogramma*. *Phytochem* 19: 83-87
- Desai, J. D. und Banat, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64
- Develter, D. und Laurysen, L. (2010) Properties and industrial applications of sophorolipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 112: 628-638
- Edwards, J. und Hayashi, J. (1965) Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys* 111: 415-421
- Esders, T. und Light, R. (1972) Glucosyl- and acetyltransferases involved in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. *J Biol Chem* 247: 1375-1386
- Fabry, B. (1991) Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendung. *Chemie in unserer Zeit* 4: 214-222
- Fleurackers, S. J. J. (2006) On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 108: 5-12
- Fleurackers, S. J. J., Van Bogaert, I. N. A. und Develter, D. (2010) On the production and identification of medium-chained sophorolipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 112: 655-662
- Fu, S. L., Wallner, S. R., Bowne, W. B., Hagler, M. D., Zenilman, M. E., Gross, R. und Bluth, M. H. (2008) Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 148: 77-82
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T. und Kitamoto, D. (2007) Characterization of new types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced from soybean oil by a basidiomycetous yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *J Oleo Sci* 56: 435-442

- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T. und Kitamoto, D. (2007) Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. *Biotechnol Lett* 29: 1111-1118
- Fukuoka, T., Yanagihara, T., Imura, T., Morita, T., Sakai, H., Abe, M. und Kitamoto, D. (2011) Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D and its aqueous phase behavior. *Carbohydr Res* 346: 266-271
- Fürstner, A., Radkowski, K., Grabowski, J., Wirtz, C. und Mynott, R. (2000) Ring-closing alkyne metathesis. Application to the total synthesis of sophorolipid lactone. *J Org Chem* 65: 8758-8762
- Ganske, F., Meyer, H. H., Deutz, H. und Bornscheuer, U. T. (2003) Enzyme-catalyzed hydrolysis of 18-methyl eicosanoic acid-cysteine thioester. *Eur J Lipid Sci Technol* 105: 627-632
- Giani, C., Wullbrandt, D., Rothert, R. und Meiwes, J. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. United States Patent 5658793
- Gorin, P., Spencer, J. und Tulloch, A. (1961) Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can J Chem* 39: 846-855
- Gunther, W., Nuñez, A., Fett, W. und Solaiman, D. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 71: 2288-2293
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marqués, A., Busquets, M. und Manresa, A. (2000) Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzym Microbiol Technol* 26: 40-44
- Hammen, S. (2003) Chemoenzymatische Modifikation von nativen und hydrolysierten Sophorolipiden. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Harkins, W. D. und Jordan, H. F. (1930) A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *J Am Chem Soc* 52: 1751
- Heckmann, R. (1995) Screening nach Glycolipid produzierenden Mikroorganismen
- Heinz, E., Tulloch, A. und Spencer, J. (1970) Hydroxylation of oleic acid by cell-free extracts of a species of *Torulopsis*. *Biochim Biophys Acta* 202: 49-55
- Heusch, R. (1993). Grundlagen zur Emulgierwirkung von Tensiden: Die Tenside. Kosswig, K. and Stache, H.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J. und Bölker, M. (2006) Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 5469-5477
- Hoffmann, N., Pietruszka, J. und Söffing, C. (2012) From sophorose lipids to natural product synthesis. *Adv Synth Catal* 354: 959-963
- Hölzl, G. und Dörmann, P. (2007) Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res* 46: 225-243
- Hommel, R. K., L., W., Weiss, A., Himmelreich, U., Rilke, O. und Kleber, H.-P. (1994) Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *J Biotechnol* 33: 147-155
- Hörmann, B., Müller, M. M., Sydatk, C. und Hausmann, R. (2010) Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509. *Eur J Lipid Sci Technol* 112: 674-680
- Hu, Y. und Ju, L. K. (2003) Lipase-mediated deacetylation and oligomerization of lactonic sophorolipids. *Biotechnol Prog* 19: 303-311

- Igarashi, S., Hattori, Y. und Maitani, Y. (2006) Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. *J Control Release* 112: 362-368
- Im, J. H., Yanagishita, H., Ikegami, T., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N. und Kitamoto, D. (2003) Mannosylerythritol lipids, yeast glycolipid biosurfactants, are potential affinity ligand materials for human immunoglobulin G. *J Biomed Mater Res A* 65: 379-385
- Imura, T., Ito, S., Azumi, R., Yanagishita, H., Sakai, H., Abe, M. und Kitamoto, D. (2007) Monolayers assembled from a glycolipid biosurfactant from *Pseudozyma (Candida) antarctica* serve as a high-affinity ligand system for immunoglobulin G and M. *Biotechnol Lett* 29: 865-870
- Inoh, Y., Kitamoto, D., Hirashima, N. und Nakanishi, M. (2004) Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. *J Control Release* 94: 423-431
- Inoue, S. (1988) Biosurfactant in cosmetic applications. World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry, USA
- Ishigami, Y., Gama, Y. und Kitamoto, D. (1992). Soporoselipid derivatives. Japanese Patent 4-279561
- Isoda, H., Kitamoto, D., Shinmoto, H., Matsumura, M. und Nakahara, T. (1997) Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 609-614
- Ito, C. M., Itoigawa, M., Ju-ichi, N., Sakamoto, H., Nishino, H., Tokuda, H. und Furukawa (2005) Antitumor-promoting activity of coumarins from citrus plants. *Planta Med* 71: 84-87
- Ito, S., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T., Sakai, H., Abe, M. und Kitamoto, D. (2007) Kinetic studies on the interactions between glycolipid biosurfactant assembled monolayers and various classes of immunoglobulins using surface plasmon resonance. *Colloids and Surf B: Biointerfaces* 58: 165-171
- Jarvis, F. und Johnson, M. (1949) A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* 71: 4124-4126
- Jones, R., Fekete, T., Truant, A. und Satishchandran, V. (1994) Persistent bacteremia due to *Tsukamurella paurometabolum* in a patient undergoing hemodialysis: case report and review. *Clin Infect Dis* 18: 830-832
- Kang, S. W., Kim, Y. B., Shin, J. D. und Kim, E. K. (2010) Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 780-790
- Kawashima, H., Nakahara, T., Oogaki, M. und Tabuchi, T. (1983) Extracellular production of a mannosylerythritol lipid by a mutant of *Candida* sp. from n-alkanes and triacylglycerols. *J Ferment Technol* 61: 143-149
- Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C. und Tabuchi, T. (1990) Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. *Agri Biol Chem* 54: 31-36
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C. und Nakahara, T. (1993) Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol* 29: 91-96
- Kitamoto, D., Isoda, H. und Nakahara, T. (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants-from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng* 94: 187-201

- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T., Konishi, M. und Imura, T. (2009) Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr Op Coll Interf Sci* 14: 315-328
- Klekner, V., Kosaric, N. und Zhou, Q. H. (1991) Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol Lett* 13: 345-348
- Kloos, W., Schleifer, K. und Götz, R. (1991). The genus *Staphylococcus*: The Prokaryotes : A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Balows, H. et al. Springer.
- Knepper, T. und Berna, J. (2003). Surfactants: properties, production, and environmental aspects: Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment. Elsevier Science.
- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Kakugawa, K. und Kitamoto, D. (2007a) Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 521-531
- Konishi, M., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T. und Kitamoto, D. (2007b) A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows high binding affinity towards lectins on a self-assembled monolayer system. *Biotechnol Lett* 29: 473-480
- Lämmle, K. (1997) Untersuchung zur adsorptiven und keimabtötenden Wirkung von ACTISORB Plus auf verschiedene Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Stuttgart
- Lang, S., Katsiwela, E. und Wagner, F. (1989) Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Sci Technol* 9: 363-366
- Lang, S., Brakemeier, A., Rau, U., Spöckner, S. und Wagner, F. (1996). Oberflächenaktive Sophoroselipide von *Candida bombicola*: Tagungsband. Hefe und Hefeprodukte.
- Lang, S. und Wullbrandt, D. (1999) Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 22-32
- Lang, S. und Trowitzsch-Kienast, W. (2002) Biotenside. B.G. Teubner GmbH, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden
- Lang, S., Beil, W., Tokuda, H., Wicke, C. und Lurtz, V. (2004) Improved production of bioactive glucosylmannosyl-glycerolipid by sponge-associated *Microbacterium* species. *Mar Biotechnol* 6: 152-156
- Langer, O. (2004) HPLC-gestützte Analyse, Optimierung der mikrobiellen Produktion und enzymatische Modifizierung von Glycolipiden aus *Tsukamurella* spec. nov. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Langer, O., Palme, O., Wray, V., Tokuda, H. und Lang, S. (2006) Production and modification of bioactive biosurfactants. *Proc Biochem* 41: 2138-2145
- Linhardt, R., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F. und Pickenhagen, W. (1989) Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* 33: 365-368
- Lurtz, V. (2006) Biotechnologische Produktion und Modifikation mariner Glycoglycerolipide. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Magario, I., Vielhauer, O., Neumann, A., Hausmann, R. und Sylatk, C. (2008b) Kinetic analysis and modeling of the liquid–liquid conversion of emulsified di-rhamnolipids by Naringinase from *Penicillium decumbens*. *Biotechnol Bioeng* 102: 9-19
- Magario, I., Neumann, A., Vielhauer, O., Sylatk, C. und Hausmann, R. (2009) Evaluation of enzyme carriers as biocatalysts for the conversion of emulsified rhamnolipids. *Biocatal Biotrans* 27: 237-245
- Maier, R. M. und Soberón-Chávez, G. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Biochem Biotechnol* 54: 625-633

- Marsudi, S., Unno, H. und Hori, K. (2008) Palm oil utilization for simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol* 78: 955-961
- Mendoza, C. R., Jiménez, I. A., Tokuda, H., Kushida, H. und Bazzocchi, I. L. (2005) Antitumor-promoting effects of new sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii*. *Chem Biodivers* 2: 286-294
- Monteiro, S., Sassaki, G., de Souza, L., Meira, J., de Araújo, J., Mitchell, D., Ramos, L. und Krieger, N. (2007) Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem Phys Lipids* 147: 1-13
- Morita, T., Ishibashi, Y., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, H., Abe, M. und Kitamoto, D. (2009) Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, using sucrose by fungal and yeast strains, and their interfacial properties. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2352-2355
- Morita, T., Kitagawa, M., Yamamoto, S., Sogabe, A., Imura, T., Fukuoka, T. und Kitamoto, D. (2010) Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair. *J Oleo Sci* 59: 267-272
- Müller, M. M., Hörmann, B., Syltatk, C. und Hausmann, R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 167-174
- Mulligan, C. N., Yong, R. N. und Gibbs, B. F. (2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J Hazard Mater* 85: 111-125
- Munk, C. et al. (2011) Complete genome sequence of *Tsukamurella paurometabola* type strain (no. 33). *Genomic Sci* 4: 342-351
- Nakata, T., Yamada, T., Taji, S., Ohishi, H., Wada, S.-i., Tokuda, H., Sakuma, K. und Tanaka, R. (2007) Structure determination of inonotsuoxides A and B and *in vivo* anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Bioorganic Med Chem* 15: 257-264
- Nguyen, T., Youssef, N., McInerney, M. und Sabatini, D. (2008) Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res* 42: 1735-1743
- Nuñez, A., Foglia, T. A. und Ashby, R. (2003) Enzymatic synthesis of a galactopyranose sophorolipid fatty acid-ester. *Biotechnol Lett* 25: 1291-1297
- Nuñez, A., Ashby, R., Foglia, T. A. und Solaiman, D. K. (2004) LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. *Biotechnol Lett* 26: 1087-1093
- Ochsner, U. A. und Reiser, J. (1995a) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 92: 6424-6428
- Ochsner, U. A., Reiser, J., Fiechter, A. und Wiltholt, B. (1995b) Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl Environ Microbiol* 61: 3503-3506
- Oliveira, F. J. S., Vazquez, L., de Campos, N. P. und de França, F. P. (2009) Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Proc Biochem* 44: 383-389
- Otto, R. T., Bornscheuer, U. T., Scheib, H., Pleiss, J., Syltatk, C. und Schmid, R. D. (1998) Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: Synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters. *Biotechnol Lett* 20: 1091-1094
- Otto, R. T., Daniel, H. J., Pekin, G., Muller-Decker, K., Furstenberger, G., Reuss, M. und Syltatk, C. (1999) Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 495-501

- Otto, R. T., Scheib, H., Bornscheuer, U. T., Pleiss, J., Sylđatk, C. und Schmid, R. D. (2000) Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in synthesis of arylaliphatic glycolipids. J Mol Catal B Enzym 8: 201-211
- Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D., Wray, V. und Lang, S. (2010) Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. Eur J Lipid Sci Technol 112: 663-673
- Park, J. B. (2010) Studien zur enzymatischen Modifikation von Sophoroselipiden. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Parra, J., Guinea, J., Manresa, M., Robert, M., Mercadé, M., Comelles, F. und Bosch, M. (1989) Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. JAOCS 66: 141-145
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. und Iglewski, B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol 179: 5756-5767
- Petrovic, M. und Barcelo, D. (2004) Fate and removal of surfactants and related compounds in wastewaters and sludges. Emerging organic pollutants in waste waters and sludge; The handbook of environmental chemistry 5/1: 95-108
- Phaff, H. J. und Starmer, W. T. (1987). Yeasts associated with plants, insects and soil: The Yeasts. Academic Press.
- Pinzon, N. und Ju, L.-K. (2009) Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. Appl Microbiol Biotechnol 82: 975-981
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. und Wagner, F. (1991) Marine biosurfactants. III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Z Naturforsch C 46: 210-216
- Potvin, E., Sanschagrin, F. und Levesque, R. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev 32: 38-55
- Rahman, K., Banat, I., Thahira, J., Thayumanavan, T. und Lakshmanaperumalsamy, P. (2002) Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresour Technol 81: 25-32
- Rahman, K. S., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R. und Banat, I. M. (2002) Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. Biotechnol Prog 18: 1277-1281
- Ramana, K. und Karanth, N. (1989) Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J Chem Technol Biotechnol 45: 249-257
- Ramm, W. (2001) Bildung und Charakterisierung biologisch und physiko-chemisch aktiver Metabolite aus den marinen schwamm-assoziierten Bakterien *Psychroflexus* spec. nov. und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Ramm, W., Schatton, W., Wagner-Döbler, I., Wray, V., Nimtz, M., Tokuda, H., Enjyo, F., Nishino, H., Beil, W., Heckmann, R., Lurtz, V. und Lang, S. (2004) Diglucosylglycerolipids from marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. Appl Biochem Biotechnol 64: 497-504
- Rau, U., Manzke, C. und Wagner, F. (1996) Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. Biotechnol Lett 18: 149-154
- Rau, U., Heckmann, R., Wray, V. und Lang, S. (1999) Enzymatic conversion of a sophorolipid into a glucose lipid. Biotechnol Lett 21: 973-977

- Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R., Wray, V. und Lang, S. (2001) Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind Crops Prod* 13: 85–92
- Rau, U., Nguyen, L. A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M., Roeper, H., Koch, H. und Lang, S. (2005a) Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 551-559
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H. und Lang, S. (2005b) Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 607-613
- Saerens, K., Van Bogaert, I., Soetaert, W. und Vandamme, E. (2009) Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: Optimization and kinetics. *Biotechnol J* 4: 1-8
- Sakurai, N., Kozuka, M., Tokuda, H., Nobukuni, Y., Takayasu, J., Nishino, H., Kusano, A., Kusano, G., Nagai, M., Sakurai, Y. und Lee, K.-H. (2003) Antitumor agents 220. Antitumor-Promoting effects of cimigenol and related compounds on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Bioorg Med Chem* 11: 1137-1140
- Sakurai, N., Kozuka, M., Tokuda, H., Mukainaka, T., Enjo, F., Nishino, H., Nagai, M., Sakurai, Y. und Lee, K.-H. (2005) Cancer preventive agents. Part 1: Chemopreventive potential of cimigenol, cimigenol-3,15-dione, and related compounds. *Bioorg Med Chem* 13: 1403-1408
- Schippers, C., Gessner, K., Muller, T. und Scheper, T. (2000) Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J Biotechnol* 83: 189-198
- Scholz, C., Mehta, S., Bisht, K., Guilmanov, V., Kaplan, D., Nicolosi, R. und Gross, R. (1998) Bioactivity of extracellular glycolipids - investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid-derivates. *Polymer Reprints* 39: 168-169
- Schulz, D. (1992) Strukturaufklärung und Charakterisierung von Biotensiden des marinen Bakteriums *Arthrobacter sp.* SI1 und der marinen Hefe NS/JR1. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Azim, A. und Gross, R. (2005) Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4093-4100
- Shah, V., Jurjevic, M. und Badia, D. (2007) Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. *Biotechnol Prog* 23: 512-515
- Shirahashi, H., Murakami, N., Watanabe, M., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H. und Iwashima, A. (1993) Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41: 1664-1666
- Singh, S. K., Felse, A. P., Nuñez, A., Foglia, T. A. und Gross, R. A. (2003) Regioselective enzyme-catalyzed synthesis of sophorolipid esters, amides, and multifunctional monomers. *J Org Chem* 68: 5466-5477
- Soberón-Chávez, G. und Maier, R. (2011). *Biosurfactants: A General Overview: Microbiology Monographs*. Soberón-Chávez, G. Springer Berlin / Heidelberg.
- Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A. und Foglia, T. A. (2007) Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* 29: 1341-1347
- Spöckner, S. (1994) Funktionalisierung eines mikrobiellen Sophoroselipides. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig

- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M. und Lang, S. (1999) Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 33-39
- Stahl, E. (1967) Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag Berlin
- Steffen, B. (1994) Lipasekatalysierte Synthese von Wachsesteren und Monoglyceriden aus ungewöhnlichen Fettsäurekomponenten sowie Bestimmung ihrer Grenzflächeneigenschaften. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Steinhaus, E. (1941) A study of the bacteria associated with thirty species of insects. *J Bacteriol* 42: 757-790
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. und Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964
- Syldatk, C. (1984) Mikrobielle Bildung und Charakterisierung grenzflächenaktiver Rhamnolipide aus *Pseudomonas* spec. DSM 2874. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. und Witte, L. (1985a) Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z Naturforsch C* 40: 51-60
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. und Wagner, F. (1985b) Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z Naturforsch C* 40: 61-67
- Thaniyavarn, J., Chianguthai, T., Sangvanich, P., Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. und Thaniyavarn, S. (2008) Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 2061-2068
- Trummel, K., Effenberger, F. und Syldatk, C. (2003) An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. *Eur J Lipid Sci Technol* 105: 563-571
- Tuleva, B., Ivanov, G. und Christova, N. (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Z Naturforsch C* 57: 356-360
- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2007a) Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 23-34
- Van Bogaert, I. N. A., De Maeseneire, S. L., De Schamphelaire, W., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2007b) Cloning, characterization and functionality of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (URA3) of the glycolipid-producing yeast *Candida bombicola*. *Yeast* 24: 201-208
- Van Bogaert, I. N. A., De Maeseneire, S. L., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2008a) Development of a transformation and selection system for the glycolipid-producing yeast *Candida bombicola*. *Yeast* 25: 273-278
- Van Bogaert, I. N. A., De Maeseneire, S. L., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2008b) Cloning and characterisation of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene of *Candida bombicola* and use of its promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1085-1092



- Van Bogaert, I. N. A., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2008c) Cerulenin inhibits de novo sophorolipid synthesis of *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* 30: 1829-1832
- Van Bogaert, I. N. A., Sabirova, J., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2009) Knocking out the MFE-2 gene of *Candida bombicola* leads to improved medium-chain sophorolipid production. *FEMS Yeast Res* 9: 610-617
- Van Bogaert, I. N. A., De Mey, M., Develter, D., Soetaert, W. und Vandamme, E. J. (2010) Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. *FEMS Yeast Res* 10: 791-791
- Vollbrecht, E., Heckmann, R., Wray, V., Nimtz, M. und Lang, S. (1998) Production and structure elucidation of di- and oligosaccharide lipids (biosurfactants) from *Tsukamurella* sp. nov. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 530-537
- Vollbrecht, E. (1999) Mikrobielle Produktion von Oligosacchardlipiden auf der Basis pflanzlicher Öle durch *Tsukamurella* spec. nov. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Vollbrecht, E., Rau, U. und Lang, S. (1999) Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Lipid* 10: 389-394
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P., Goddard, W. und Tang, Y. (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng* 98: 842-853
- Wei, Y., Chou, C. und Chang, J. (2005) Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J* 27: 146-154
- Weon, H., Yoo, S., Anandham, R., Schumann, P., Kroppenstedt, R., Kwon, S. und Stackebrandt, E. (2010) *Tsukamurella soli* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1667-1671
- Wicke, C. (1999) Produktion und Charakterisierung von biologisch und physiko-chemisch wirksamen Metaboliten aus dem marinen schwammassoziierten *Microbacterium* spec. nov. DSM 12583. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U. und Lang, S. (2000) Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge-associated *Microbacterium* species. *J Nat Prod* 63: 621-626
- Williams, P. und Cámara, M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12: 182-191
- Yamaguchi, M., Sato, A. und Yukuyama, A. (1976) Microbial production of sugar lipids. *Chem Ind* 4: 741-742
- Zerkowski, J., Solaiman, D., Ashby, R. und Foglia, T. A. (2006) Head group-modified sophorolipids: Synthesis of new cationic, zwitterionic, and anionic surfactants. *JSD* 9: 57-62
- Zhang, G., Wu, Y., Qian, X. und Meng, Q. (2005) Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J Zhejiang Univ Sci* 6: 725-730

## IV Abkürzungsverzeichnis

3-OH-C10	3-Hydroxy-Decansäure
C10	Decansäure
17-OH-C18	17-Hydroxy-Stearinsäure
C18	Stearinsäure
CBS	<u>C</u> entraal <u>b</u> ureau voor <u>S</u> chimmelcultures, Utrecht, NL
COSY	<u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DMBA	7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracen
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> tammsammlung für <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen, Braunschweig, Deutschland
EBV	Epstein-Barr-Virus
ESI MS	<u>E</u> lectron <u>S</u> pray <u>I</u> onization <u>M</u> ass <u>S</u> pectra
HGG	Heptyl-Galactosyl-Glycerid
HRESI MS	<u>H</u> igh <u>R</u> esolution <u>E</u> lectron <u>S</u> pray <u>I</u> onization <u>M</u> ass <u>S</u> pectra
LM	Laufmittel
LSM	Lösungsmittel
MEL	Mannosylerythritol-Lipid
MPLC	Mitteldruckchromatographie
MS	Massenspektrometrie
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance
NP	Normalphase
OSL	Oligosaccharidlipide
QTOF MS	Quadrupole Time-of-Flight Massenspektrometrie
RL	Rhamnoselipid
SL	Sophoroselipid
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-Acetat

## V Anhang

### 1. Tabellen zur Strukturaufklärung

**Tabelle VI. 1:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **SL-E<sub>2-12</sub>** (aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Gruppen		$^{13}\text{C}$ -NMR (150MHz)
		$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	102.4
	C-2'	83.9
	C-3'	78.0
	C-4'	71.4
	C-5'	77.7
	C-6'A	62.7
	C-6'B	-
	C-1''	105.6
	C-2''	76.1
	C-3''	77.6
	C-4''	71.4
	C-5''	75.6
	C-6''A	65.0
	C-6''B	-
	$\text{CH}_3\text{COO}^-$ (C-6'')	20.9 / 172.7
Alkohol	C-1	21.8
	C-2	78.0
	C-3 A	37.7
	C-3 B	
	C-4 – C-11	23.7 – 33.1
	C-12	14.4

**Tabelle VI. 2:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **SL-D<sub>2-12</sub>** (aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

Gruppen		$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (150MHz)
		$\delta$ (ppm) / J (Hz)	$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.8	102.7
	C-2'	3.49 dd / 7.8/8.9	82.0
	C-3'	3.60 t / 8.9	78.3
	C-4'	3.31 – 3.36 m	71.5 <sup>a</sup>
	C-5'	3.31 – 3.36 m	77.8
	C-6'A	3.87 – 3.90 m	62.8
	C-6'B	3.68 – 3.70 m	-
	C-1''	4.68 d / 7.8	104.7
	C-2''	3.29 dd / 7.8/8.9	75.9
	C-3''	3.41 t / 8.9	78.3
	C-4''	3.31 – 3.36 m	71.7 <sup>a</sup>
	C-5''	3.36 – 3.42 m	77.8
	C-6''A	3.87 – 3.90 m	63.1
	C-6''B	3.68 – 3.70 m	-
Alkohol	C-1	1.28 d / 6.3	21.9
	C-2	3.84 – 3.86 m	78.8
	C-3 A	1.46 – 1.55 m	37.8
	C-3 B	1.63 – 1.68 m	-
	C-4 – C-11	1.34 m	23.7 - 33.1
	C-12	0.94 t / 7.0	14.4

<sup>a</sup> austauschbar innerhalb der Spalte

**Tabelle VI. 3:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **SL-E<sub>2-12</sub>-di-C10** (aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Gruppen		$^{13}\text{C}$ -NMR (100MHz)
		$\delta$ (ppm)
Sophorose	C-1'	102.5
	C-2'	83.9
	C-3'	77.9
	C-4'	71.4 <sup>a</sup>
	C-5'	75.0 <sup>b</sup>
	C-6'A	64.6
	C-6'B	-
	C-1''	105.8
	C-2''	76.2
	C-3''	77.6
	C-4''	71.6 <sup>a</sup>
	C-5''	75.7 <sup>b</sup>
	C-6''A	64.6
	C-6''B	-
Alkohol	C-1	22.0
	C-2	78.3
	C-3 A	37.9
	C-3 B	
	C-4 – C-11	23.7 – 33.0
	C-12	14.4
Acylrest (2x)	C-1	177.9 / 175.3
	C-2	35.1 / 35.3
	C-3	s. C-4 – C-11 (Alkohol)
	C-4	s. C-4 – C-11 (Alkohol)
	C-5 – C-9	s. C-4 – C-11 (Alkohol)
	C-10	14.4

<sup>a,b</sup> austauschbar innerhalb der Spalte

**Tabelle VI. 4:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **MEL-A-3-OH-C10**, **MEL-A-17-OH-C18** und **MEL-B-3-OH-C10** (aufgenommen in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 7:3$ )

		MEL-A-3-OH-C10	MEL-A-17-OH-C18	MEL-B-3-OH-C10
Gruppen		$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz)	$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz)
		$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
D-Mannose	C-1'	99.6	99.6	99.6
	C-2'	68.6	68.0	68.6
	C-3'	70.8	70.9	70.8
	C-4'	66.3	66.3	74.8
	C-5'	72.6	72.6	72.6
	C-6'A	62.8	62.8	63.9
	$\text{CH}_3\text{-COO-(C-4')}$	20.8 / 170.2	20.8 / 170.2	-
	$\text{CH}_3\text{-COO-(C-6')}$	20.8 / 171.6	20.8 / 171.6	20.8 / 172.1
meso-	C-1A	66.2	66.0	65.4
Erythritol	C-2	71.3	71.4	70.9
	C-3	69.2	68.0	69.5
	C-4A	72.2	72.1	70.1
Acylreste	-C=O (C-2')	173.3	174.1	173.2
	(C-3')	173.2	173.3	173.2
	(C-1)	174.1	175.0	173.9
	-CO- <u>CH<sub>2</sub></u> - (C-2')	34.4	34.4	34.4
	(C-3')	34.3	34.3	34.4
	(C-1)	34.4	34.4	34.4
	-CO-CH <sub>2</sub> - <u>CH<sub>2</sub></u> -	22.8 – 32.2		22.8 – 32.1
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	22.8 – 32.2	22.8 – 32.1	22.8 – 32.1
	-CH <sub>3</sub>	14.2	14.1, 14.2	14.2
	-CO- <u>CH<sub>2</sub></u> -CHOH-	37.2	-	37.2
	-CO-CH <sub>2</sub> - <u>CHOH</u> -CH <sub>2</sub> -	70.1	-	70.1
	-CHOH- <u>CH<sub>2</sub></u> -CH <sub>2</sub> -	22.8 – 32.2	-	22.8 – 32.1
	- <u>CH<sub>2</sub></u> -CHOH-CH <sub>3</sub>	-	39.4	-
	-CH <sub>2</sub> - <u>CHOH</u> -CH <sub>3</sub>	-	68.0	-
	-CHOH- <u>CH<sub>3</sub></u>	-	23.1	-

**Tabelle VI. 5:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von **SL<sub>18</sub>, Klassisch** (aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppel-Dublett, m: Multiplett

		<b>SL<sub>18</sub>, Klassisch</b>
<b>Gruppen</b>		<b><math>^1\text{H}</math>-NMR (600 MHz)</b>
		<b><math>\delta</math> (ppm) / J (Hz)</b>
Sophorose	C-1'	4.49 d / 7.7
	C-2'	3.46 dd / 7.7/9.1
	C-3'	3.60 t / 9.1
	C-4'	3.34 dd / ~9.5/9.5
	C-5'	3.50 ddd / 2.2/6.5/9.8
	C-6'A	4.40 dd / 2.3/11.8
	C-6'B	4.23 dd / 6.6/11.9
	C-1''	4.66 d / 7.7
	C-2''	3.36 dd / 7.7/9.5
	C-3''	3.63 dd / 9.5/9.5
	C-4''	4.94 t / 9.6
	C-5''	3.69 ddd / 2.5/4.4/~10
	C-6''A	4.19 dd / 2.5/12.2
	C-6''B	4.14 dd / 4.6/12.2
	CH <sub>3</sub> COO- (C-6')	2.08 s <sup>a</sup>
	CH <sub>3</sub> COO- (C-6'')	2.10 s <sup>a</sup>
C18:1 Fettsäure	C-1	-
	C-2	2.42 m
	C-3	1.70 m
		1.62 m
	C-4 – C-6	1.50 – 1.30 m
	C-7	1.39 m
	C-8, C-11	2.10 m
	C-9, C-10 (-CH=CH-)	5.38 m
	C-12	1.39 m
	C-13 – C-15	1.50 – 1.30 m
	C-16A	1.62 m
	C-16B	1.50 m
	C-17	3.79 m
	C-18	1.25 d / 6.2

<sup>a</sup> austauschbar innerhalb der Spalte

## 2. Tabellen zum *in vivo*-Aktivitätstest

**Tabelle VII. 1:** Daten der *in vivo*-Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen. Substanzen: Positivkontrolle (PK), SL-E<sub>2-12</sub> und GL-A<sub>2-12</sub>

Woche	DMBA (390 nmol) +	Wirkstoff (85 nmol)	Wirkstoff (85 nmol)
	TPA (1,7 nmol) <b>PK</b>	<b>SL-E<sub>2-12</sub></b>	<b>GL-A<sub>2-12</sub></b>
	Papilloma/Maus	Papilloma/Maus	Papilloma/Maus
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0,3±0,95	0	0
7	0,9±1,52	0,6±1,69	0,7±1,64
8	1,2±1,55	0,9±1,52	1,1±1,73
9	1,7±2,01	1,4±1,90	1,5±1,90
10	2,1±2,02	1,8±2,04	1,9±2,08
11	2,7±1,57	2,2±2,40	2,3±2,11
12	3,2±1,40	2,7±2,45	2,7±2,06
13	3,8±1,55	3,1±2,38	3,2±2,35
14	4,7±1,50	3,5±2,51	3,6±2,55
15	5,5±1,27	4,0±2,31	4,3±2,50
16	6,0±0,94	4,2±2,35	4,4±2,32
17	6,5±0,53	4,7±1,95	4,8±1,62
18	7,1±0,57	5,3±1,06	5,6±0,70
19	7,6±0,52	5,8±0,63	6,0±0,82
20	7,9±0,74	6,0±0,67	6,3±0,95



**Tabelle VII. 2:** Daten der *in vivo*-Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen. Substanzen: SL-E<sub>2-12</sub>-di-3-OH-C10 und SL-E<sub>2-12</sub>-mono/di-17-OH-C18

Woche	Wirkstoff (85 nmol) SL-E <sub>2-12</sub> -di-3-OH-C10	Wirkstoff (85 nmol) SL-E <sub>2-12</sub> -mono/di-17-OH-C18
	Papilloma/Maus	Papilloma/Maus
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0,4±1,27	0,6±1,35
8	0,6±1,35	0,9±1,66
9	1,2±1,99	1,4±1,96
10	1,5±2,07	1,7±1,95
11	2,0±2,62	2,2±2,04
12	2,6±2,99	2,7±2,36
13	2,8±3,01	3,0±2,26
14	3,1±2,85	3,3±2,36
15	3,5±3,03	3,9±2,33
16	3,7±2,83	4,2±2,30
17	4,0±2,54	4,6±1,90
18	4,6±2,01	5,3±1,06
19	4,8±1,55	5,7±0,67
20	5,1±1,10	5,9±0,88

**Tabelle VII. 3:** Daten der *in vivo*-Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen. Substanzen: 3-OH-C10 und 17-OH-C18

Woche	Wirkstoff (85 nmol)	Wirkstoff (85 nmol)
	<b>3-OH-C10</b>	<b>17-OH-C18</b>
	Papilloma/Maus	Papilloma/Maus
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0,4±1,26	0,8±1,69
8	0,6±1,35	1,1±1,66
9	1,3±1,99	1,5±1,72
10	1,7±2,07	2,0±2,28
11	2,2±2,62	2,3±2,16
12	2,6±2,99	2,8±2,15
13	2,9±3,01	3,2±2,25
14	3,2±2,85	3,8±2,15
15	3,5±3,03	4,3±2,07
16	3,8±2,83	4,5±2,41
17	4,2±2,54	4,9±1,56
18	4,6±2,01	5,6±0,84
19	4,9±1,55	6,1±0,74
20	5,4±1,10	6,6±0,97

**Tabelle VII. 4:** Daten der *in vivo*-Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen. Substanzen: MEL-A, MEL-A-3-OH-C10 und MEL-A-17-OH-C18

Woche	Wirkstoff (85 nmol)	Wirkstoff (85 nmol)	Wirkstoff (85 nmol)
	<b>MEL-A</b> Papilloma/Maus	<b>MEL-A-3-OH-C10</b> Papilloma/Maus	<b>MEL-A-17-OH-C18</b> Papilloma/Maus
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0,2±0,63	0,7±1,56
8	0,1±0,32	0,4±0,84	0,9±1,58
9	0,3±0,68	0,9±1,45	1,3±1,77
10	0,6±1,10	1,5±1,96	1,5±1,96
11	1,1±1,92	1,7±2,21	2,0±2,16
12	1,4±1,96	1,8±2,35	2,5±2,22
13	2,0±2,58	2,2±2,35	2,8±2,44
14	2,6±2,88	3,0±2,11	3,3±2,41
15	3,1±2,85	3,4±1,90	3,8±2,20
16	3,4±2,95	3,7±2,06	4,3±1,77
17	3,6±2,76	4,0±2,16	4,6±1,90
18	4,0±2,83	4,4±1,65	5,1±1,29
19	4,4±2,50	4,8±0,92	5,4±0,70
20	4,6±2,17	5,2±0,63	5,9±0,74

**Tabelle VII. 5:** Daten der *in vivo*-Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen. Substanzen: MEL-B und MEL-B-3-OH-C10

Woche	Wirkstoff (85 nmol)	Wirkstoff (85 nmol)
	<b>MEL-B</b>	<b>MEL-B-3-OH-C10</b>
	Papilloma/Maus	Papilloma/Maus
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0,6±1,26
8	0,1±0,32	0,7±1,49
9	0,4±0,84	1,1±1,53
10	0,9±1,45	1,3±1,77
11	1,3±2,11	1,8±1,93
12	1,7±2,26	2,2±2,04
13	2,1±2,33	2,7±2,36
14	2,7±2,87	3,0±2,26
15	3,2±2,82	3,6±2,17
16	3,6±2,63	3,9±2,33
17	3,9±2,73	4,2±1,87
18	4,2±2,39	4,6±1,27
19	4,5±2,22	5,1±0,88
20	4,9±2,08	5,5±0,85